

**UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
Carrera De Ingeniería Agronómica**

**“EVALUACIÓN PRELIMINAR DE SOPORTES PARA LA
PRODUCCIÓN DE INOCULANTES DE *Azotobacter spp* BAJO
CONDICIONES DE LABORATORIO E INVERNADERO,
TUMBACO, PICHINCHA.”**

**TESIS DE GRADO PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO
AGRÓNOMO**

DAVID SAÚL CASTRO PÉREZ.

QUITO - ECUADOR

2014

DEDICATORIA

Dedico esta investigación a mis padres y mis hermanos.
Verónica Pérez, Fabián Castro.Melanie, Sarahi y Josafath
Castro.

Dedico también a quién hoy por hoy ha sido mi fortaleza y
mi compañera Mishel Cruz.

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme una nueva oportunidad en la vida.

A la Universidad Central Del Ecuador y en especial a todos los miembros de la Facultad De Ciencias Agrícolas.

A mis Maestros quienes transmitieron además de conocimiento supieron encaminarme por el sendero de valores y enseñanzas de vida.

A mi Director Hugo Orellana con quien tuve la dicha de trabajar en un ambiente muy enriquecedor.

A mis compañeros del Laboratorio de Microbiología y Fitopatología, en especial a Danny Burgos y Darío Trujillo.

A todos aquellos que estuvieron de una u otra manera apoyándome en esta etapa de la vida.

A Todos Muchas Gracias.

AUTORIZACIÓN DE LA AUTORÍA INTELECTUAL

Yo, David Saúl Castro Pérez, en calidad de autor del trabajo de investigación o tesis realizada sobre **“EVALUACIÓN PRELIMINAR DE SOPORTES PARA LA PRODUCCIÓN DE INOCULANTES DE *Azotobacter spp* BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO E INVERNADERO, TUMBACO, PICHINCHA.”** Por la presente autorizo a la UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR, hacer uso de todos los contenidos que me pertenecen o de parte de los que contiene esta obra, con fines estrictamente académicos o de investigación.

Los derechos que como autor me corresponden con la excepción de la presente autorización, seguirán vigentes a mi favor, de conformidad con lo establecido en los artículos 5, 6, 8, 19 y demás pertinentes de la ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.

Quito, 03 de enero del 2014.



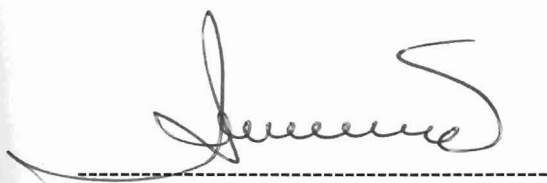
FIRMA

C.C.: 1719815357

CERTIFICACIÓN

En calidad de tutor del trabajo de graduación cuyo título es: **“EVALUACIÓN PRELIMINAR DE SOPORTES PARA LA PRODUCCIÓN DE INOCULANTES DE *Azotobacter spp* BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO E INVERNADERO, TUMBACO, PICHINCHA.”**, presentado por el señor **DAVID SAÚL CASTRO PÉREZ**, certifico haber revisado y corregido, por lo que apruebo el mismo.

Tumbaco, 03 de enero del 2014.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Manuel Suquilanda V.', is written over a horizontal dashed line.

Ing. Agr. Manuel Suquilanda V., M. Sc.

TUTOR

Tumbaco, 03 de enero de 2014.

Ingeniero

Juan León Fuentes

DIRECTOR DE CARRERAR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

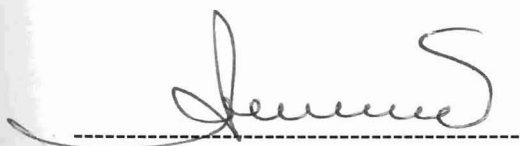
Presente

Señor Director:

Luego de las revisiones técnicas realizadas por mi persona del trabajo de graduación **“EVALUACIÓN PRELIMINAR DE SOPORTES PARA LA PRODUCCIÓN DE INOCULANTES DE *Azotobacter spp* BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO E INVERNADERO, TUMBACO, PICHINCHA.”** Llevado a cabo por parte del señor egresado **DAVID SAÚL CASTRO PÉREZ** de la Carrera de Ingeniería Agronómica, ha concluido de manera exitosa, consecuentemente el indicado estudiante podrá continuar con los trámites de graduación correspondientes de acuerdo a lo que estipulan las normativas y disposiciones legales.

Por la atención que se digne dar a la presente, reitero mi agradecimiento.

Atentamente,

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Manuel Suquilanda V.', is written over a horizontal dashed line.

Ing. Agr. Manuel Suquilanda V., M. Sc.

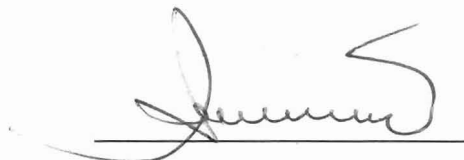
TUTOR

EVALUACIÓN PRELIMINAR DE SOPORTES PARA LA PRODUCCIÓN DE INOCULANTES DE *Azotobacter spp* BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO E INVERNADERO, TUMBACO, PICHINCHA.

APROBADO POR

Ing. Agr. Manuel Suquilanda V., M. Sc.

TUTOR DE TESIS



Ing. Agr. José Ochoa L., M. Sc.

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



Ing. Agr. Aníbal Pozo B., M. Sc.

PRIMER VOCAL



Ing. Agr. Juan Pazmiño G., M.Sc.

SEGUNDO VOCAL (BIOMETRISTA)



2014

CONTENIDO

CAPÍTULO	PÁGINAS	
1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Objetivos	2
1.2.	Hipótesis	2
2.	REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1.	Importancia y problemática de la fertilización en la agricultura.	3
2.2.	Bacterias promotoras del crecimiento vegetal.	4
2.3.	Rizósfera	9
2.4.	Bacteria <i>Azotobacter spp.</i>	10
2.5.	Biofertilizantes inoculante bacteriano	12
2.6.	Cultivo de Lechuga	17
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1.	Características del sitio experimental	21
3.2.	Materiales de laboratorio	22
3.3.	Material de invernadero	24
3.4.	Experimento de laboratorio	24
3.5.	Fase de invernadero	27
3.6.	Variables y métodos de evaluación	29
3.7.	Métodos de manejo del experimento	30
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
4.1.	Identificación de la bacteria	32
4.2.	Preselección de los soportes	32
4.3.	Selección de los soportes	34
4.4.	Fase de invernadero	57
5.	CONCLUSIONES	62
6.	RECOMENDACIONES	63
7.	RESUMEN.	64
8.	BIBLIOGRAFÍA	66
9.	ANEXOS	76

LISTA DE ANEXOS

ANEXO		PÁG.
1	Medio para el aislamiento de <i>Azotobacter spp.</i>	76
2	Características de crecimiento de <i>Azotobacter spp</i>	77
3	Caracterización morfológica de colonia de <i>Azotobacter spp</i> utilizada en el ensayo	78
4	Aislamiento primario y secundario de <i>Azotobacter spp</i>	79
5	Pruebas bioquímicas realizadas a la bacteria en estudio. (<i>Azotobacter spp</i>)	80
6	Formulaciones preseleccionadas para evaluar por 90 días en condiciones de temperatura controlada (Fase de Laboratorio).	82
7	Ubicación de los tratamientos dentro del laboratorio. (Según temperatura)	83
8	Conteo bacteriano de los soportes por el método de Woomer 1994.	84
9	Conteo de positivos y negativos por el método de Woomer 1994.	85
10	Apreciación cualitativa del crecimiento bacteriano.	86
11	Fotografías.	87

LISTA DE CUADROS

CUADROS	PÁG.	
1	Formulaciones de soportes para la evaluación de adaptación y sobrevivencia de <i>Azotobacter</i> spp. Tumbaco-Pichincha 2013.	23
2	Interacción entre soportes promisorios y temperaturas, conformados para evaluar la capacidad de brindar albergue a <i>Azotobacter</i> spp, durante 90 días. Tumbaco, Pichincha.	25
3	Análisis de la varianza para la evaluación de soportes en el mantenimiento de <i>Azotobacter</i> spp, en diferentes condiciones ambientales. Tumbaco-Pichincha, 2013.	26
4	Análisis de la varianza para la evaluación de épocas de inoculación y tipos de inoculantes de <i>Azotobacter</i> spp, en el cultivo de plantas de lactuca sativa. Tumbaco-Pichincha, 2013.	28
5	ADEVA para analizar bajo condiciones de invernadero, la influencia en el cultivo de <i>Lactuca sativa</i> , de épocas de inoculación y tipos de inoculantes de <i>Azotobacter</i> spp. Tumbaco-Pichincha. 2013.	29
6	Poblaciones bacterianas registradas en los soportes utilizados para su albergue luego de 30 días a 5°C. Tumbaco-Pichincha, 2013.	33
7	ADEVA de registros de sobrevivencia de <i>Azotobacter</i> spp en seis diferentes soportes mantenidos a 5 °C durante 15 días, Tumbaco-Pichincha. 2013.	35
8	Prueba de significación Tukey al 5% para la sobrevivencia de <i>Azotobacter</i> spp, mantenida a 5 °C durante 15 días, en seis diferentes soportes. Tumbaco-Pichincha. 2013.	36
9	Análisis estadístico de registros de sobrevivencia de <i>Azotobacter</i> spp, mantenida a 5 °C durante 45 días, en seis diferentes soportes. Tumbaco-Pichincha. 2013.	37
10	Prueba de significación Tukey al 5% para la sobrevivencia de <i>Azotobacter</i> spp mantenida a 5 °C durante 45 días, en seis diferentes soportes. Tumbaco-Pichincha. 2013.	38
11	Análisis de variancia de registros de sobrevivencia de <i>Azotobacter</i> spp, mantenida durante 90 días, en seis diferentes soportes a 5 °C. Tumbaco-Pichincha. 2013.	39
12	Prueba de significación Tukey al 5% para la sobrevivencia de <i>Azotobacter</i> spp mantenida a 5°C durante 90 días, en seis diferentes soportes. Tumbaco-Pichincha. 2013	40
13	Análisis de variancia de registros de sobrevivencia de <i>Azotobacter</i> spp, mantenida a 20°C durante 15 días, en seis diferentes soportes. Tumbaco-Pichincha. 2013.	41

CUADROS		PÁG.
14	Prueba de significación y Tukey al 5% para la sobrevivencia de <i>Azotobacter</i> spp, mantenida a 20°C durante 15 días, en seis diferentes soportes. Tumbaco-Pichincha. 2013	42
15	Análisis de variancia de registros de sobrevivencia de <i>Azotobacter</i> spp, mantenida a 20°C durante 45 días, en seis diferentes soportes. Tumbaco-Pichincha. 2013.	43
16	Prueba de significación y Tukey al 5% para la sobrevivencia de <i>Azotobacter</i> spp, mantenida a 20°C durante 45 días, en seis diferentes soportes. Tumbaco-Pichincha. 2013	44
17	Análisis de variancia de registros de sobrevivencia de <i>Azotobacter</i> spp, mantenida a 20°C durante 90 días, en seis diferentes soportes. Tumbaco-Pichincha. 2013.	45
18	Prueba de significación Tukey al 5%, para la sobrevivencia de <i>Azotobacter</i> spp, mantenida a 20°C durante 90 días, en seis diferentes soportes. Tumbaco-Pichincha. 2013.	46
19	Análisis de variancia de registros de sobrevivencia de <i>Azotobacter</i> spp, mantenida a 30°C durante 15 días, en seis diferentes soportes. Tumbaco-Pichincha. 2013.	47
20	Prueba de significación Tukey al 5%, para la sobrevivencia de <i>Azotobacter</i> spp, mantenida a 30°C durante 15 días, en seis diferentes soportes. Tumbaco-Pichincha. 2013.	48
21	Análisis de variancia de registros de sobrevivencia de <i>Azotobacter</i> spp, mantenida a 30°C durante 45 días, en seis diferentes soportes. Tumbaco-Pichincha. 2013.	49
22	Prueba de significación Tukey al 5% para la sobrevivencia de <i>Azotobacter</i> spp mantenida a 30°C durante 45 días, en seis diferentes soportes. Tumbaco-Pichincha. 2013.	50
23	Análisis de variancia de registros de sobrevivencia de <i>Azotobacter</i> spp, mantenida a 30°C durante 90 días, en seis diferentes soportes. Tumbaco-Pichincha. 2013.	51
24	Prueba de significación Tukey al 5% para la sobrevivencia de <i>Azotobacter</i> spp, mantenida a 30°C durante 90 días, en seis diferentes soportes. Tumbaco-Pichincha. 2013.	51
25	Promedio de evaluación de soportes para el mantenimiento de <i>Azotobacter</i> spp, a diferentes condiciones ambientales en laboratorio. Tumbaco-Pichincha, 2013.	53
26	Análisis de la varianza en la evaluación de soportes para el mantenimiento de <i>Azotobacter</i> spp, a diferentes condiciones ambientales. Tumbaco-Pichincha, 2013.	54

CUADROS**PÁG.**

27	Test de Tukey al 5 % para tratamientos en estudio de evaluación de soportes para el mantenimiento de <i>Azotobacter spp</i> , a diferentes condiciones ambientales. Tumbaco-Pichincha, 2013.	56
28	Test de Tukey al 5% para temperatura en estudio de evaluación de soportes para el mantenimiento de <i>Azotobacter spp</i> , a diferentes condiciones ambientales. Tumbaco-Pichincha, 2013.	57
29	Test de Tukey al 5% de soportes para el mantenimiento de <i>Azotobacter spp</i> , a diferentes condiciones ambientales. Tumbaco-Pichincha, 2013.	57
30	Análisis de la varianza para el peso de hojas funcionales de <i>Lactuca sativa</i> , var green salad bowl cultivadas con inoculaciones de <i>Azotobacter spp</i> , mantenido bajo diferentes grados de conservación. Tumbaco-Pichincha, 2013.	58
31	Promedio y rangos de significación del peso de hojas funcionales de <i>Lactuca sativa</i> , var. green salad bowl cultivadas con soportes tratados con <i>Azotobacter spp</i> . Tumbaco-Pichincha, 2013.	59
32	Tukey al 5 % para interacción entre inoculantes y épocas de inoculación de <i>Azotobacter spp</i> , en plantas de <i>Lactuca sativa</i> del registro de peso de hojas funcionales. Tumbaco-Pichincha, 2013.	60
33	Tukey al 5 % para interacción entre inoculantes y épocas de inoculación de <i>Azotobacter spp</i> , en plantas de <i>Lactuca sativa</i> del registro de peso de hojas funcionales. Tumbaco-Pichincha, 2013.	61
34	Tukey al 5 % para interacción entre inoculantes y épocas de inoculación de <i>Azotobacter spp</i> , en plantas de <i>Lactuca sativa</i> del registro de peso de hojas funcionales. Tumbaco-Pichincha, 2013.	61

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO		PÁG.
1	Sobrevivencia de <i>Azotobacter spp</i> , mantenida en diversos soportes durante 15 días a 5 °C. Tumbaco, Pichincha. 2013.	36
2	Sobrevivencia de <i>Azotobacter spp</i> , mantenida en diversos soportes durante 45 días a 5 °C. Tumbaco, Pichincha. 2013.	38
3	Sobrevivencia de <i>Azotobacter spp</i> , mantenida en diversos soportes a 5 °C durante 90 días. Tumbaco, Pichincha. 2013.	40
4	Sobrevivencia de <i>Azotobacter spp</i> , mantenida en diversos soportes durante 15 días a 20°C. Tumbaco, Pichincha. 2013.	42
5	Sobrevivencia de <i>Azotobacter spp</i> a 20°C mantenida en diversos soportes durante 45 días. Tumbaco, Pichincha. 2013.	44
6	Sobrevivencia de <i>Azotobacter spp</i> mantenida en diversos soportes durante 90 días a 20°C. Tumbaco, Pichincha. 2013.	46
7	Sobrevivencia de <i>Azotobacter spp</i> , mantenida en diversos soportes durante 15 días a 30°C. Tumbaco, Pichincha. 2013.	48
8	Sobrevivencia de <i>Azotobacter spp</i> , mantenida en diversos soportes durante 45 días a 30°C. Tumbaco, Pichincha. 2013.	50
9	Sobrevivencia de <i>Azotobacter spp</i> a 30°C mantenida en diversos soportes durante 90 días. Tumbaco, Pichincha. 2013.	52
10	Promedio de evaluación de soportes para el mantenimiento de <i>Azotobacter spp</i> , a diferentes condiciones ambientales en laboratorio. Tumbaco-Pichincha, 2013	54

“EVALUACIÓN PRELIMINAR DE SOPORTES PARA LA PRODUCCIÓN DE INOCULANTES DE *Azotobacter spp* BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO E INVERNADERO, TUMBACO, PICHINCHA.”

RESUMEN

La investigación se realizó en la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Central del Ecuador. Se evaluó la sobrevivencia de una cepa de *Azotobacter spp* inoculada en seis soportes durante un periodo de incubación de 90 días, en tres diferentes temperaturas. Los tratamientos destacados en laboratorio son t3 “Ti”+ 5°C (tierra esterilizada mantenido a 5°C), t4 “JCMe” + 5°C (Jugo de caña en solución mineral con levadura seca diluida en relación 6:3 mantenido a 5°C), y t18 “T” (turba esterilizada mantenida a 20°C), con relaciones de crecimiento que van desde 2.29×10^{10} UFC x ml⁻¹ hasta los 9.53×10^9 UFC x ml⁻¹. En invernadero se seleccionó como biofertilizantes promisorios a t9 s3i2 (turba mantenida a 20°C por 90 días con inoculaciones; en la siembra 3 y 15 días después del transplante), t8 s3i1 (turba mantenida a 20°C por 90 días con inoculaciones en la siembra y 3 días después del transplante), t5 s2i1 (tierra mantenida a 5°C por 90 días con inoculaciones en la siembra y 3 días después del transplante), que dieron un peso de hojas funcionales de 130.70 g hasta 86.06 g.

PALABRAS CLAVES: AZOTOBACTER, INOCULANTE BACTERIANO, BIOFERTILIZANTE, CONTEO BACTERIANO, FORMULACIÓN.

"PRELIMINARY ASSESSMENT OF SUPPORTS FOR PRODUCTION OF *Azotobacter spp* INOCULANTS UNDER LABORATORY CONDITIONS AND GREENHOUSE TUMBACO, PICHINCHA."

SUMARY

The investigation was conducted at the Faculty of Agricultural Sciences of the Central University of Ecuador. The survival to strain of *Azotobacter spp* inoculated into six supports during an incubation period of 90 days at three different temperatures was evaluated . Featured in laboratory treatments are t3 "Ti " +5 ° C (sterilized soil kept at 5 ° C) , t4 " JCMc " +5 ° C (cane juice mineral solution with dry yeast diluted in 6:3 ratio maintained 5 ° C) , and t18 "T" (sterile peat maintained at 20 ° C) , with ratios ranging from 2.29 growth x 10¹⁰ CFU x ml⁻¹ up to 9.53 x 10⁹ cfu ml⁻¹ . In the greenhouse was selected as promising biofertilizers t9 s3i2 (peat maintained at 20 ° C for 90 days with inoculations , in planting 3 and 15 days after transplanting) , t8 s3i1 (peat maintained at 20 ° C for 90 days with inoculations planting and 3 days after transplantation) , t5 s2i1 (land kept at 5 ° C for 90 days with inoculations at planting and 3 days after transplantation) , giving a weight of functional leaves 86.06 g to 130.70 g

KEYWORDS: AZOTOBACTER, INOCULANT BACTERIAL, BIOFERTILIZER, COUNTING BACTERIA, FORMULATION

1 INTRODUCCIÓN

Las plantas para vivir necesitan nutrirse en base de las sustancias químicas que se encuentran en el suelo, en cuyo sustrato deben existir los nutrientes en cantidad necesaria y en un balance adecuado con los otros elementos, lo cual se logra, incorporando nutrientes con criterio técnico que garanticen la obtención de una buena cosecha. En efecto, la producción agrícola ha evolucionado en gran medida con la incorporación de fertilizantes sintéticos, dando como respuesta un incremento significativo de los rendimientos, pero, a costa de la formación de una serie de condiciones y factores negativos en los agroecosistemas, por lo que en muchos suelos se observan acumulaciones importantes de sales minerales y otras combinaciones ecológicamente dañinas. Al respecto, De Felipe Anton (2003), manifiesta que el hombre puede perturbar el suelo, bien sobreexplotando la productividad del sistema, que incapaz de regenerarse se empobrece y degrada, o mediante el vertido de residuos en una proporción muy superior al que el medio puede absorber y transformar.

Esta situación encamina a la búsqueda de alternativas que cuyo fin no sea solo el producir más sino se desarrollen en circunstancias amigables con el entorno agrícola. Entre estas alternativas se ha encontrado que ciertos microorganismos han desarrollado mecanismos de relación biológicos y químicos en conjunto con las plantas debido a su estrecha relación durante todo el fenómeno evolutivo, entre ellos por la capacidad de suplantar a la fertilización química se destaca a las bacterias promotoras de crecimiento vegetal y fijadoras de nitrógeno en donde uno de los representantes es la bacteria *Azotobacter spp*, (Egas Yerovi, 2010) (Rivera, *et al*, 2011)

Concomitantemente, en la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Central Del Ecuador, se ha trabajado con bacterias promotoras de crecimiento tales como *Rizobium trifolii*, *Azotobacter chroococum*, *Azospirillum spp* y *Pseudomona spp*, en los cultivos de fréjol, lechuga y trigo. No obstante, estos estudios que han mostrado resultados halagadores se han realizado con aislamientos recientes a la investigación y se desconoce su sobrevivencia en diversos sustratos como paso previo a la utilización práctica del microorganismo (Vélez 2010), (Caicedo 2010), (Chalco 2011), (Vásquez, 2011).

A nivel mundial, para el caso de *Rhizobium spp*, el portador de la mayoría de los inoculantes es sólido y como materia prima se utiliza la turba; sin embargo, no es fácil disponer de turba de calidad o los costos de importación son elevados. Al respecto, hay materiales que por sus propiedades físicas, químicas y biológicas, podrían ser usados como portadores, tales como; cascara de limón (Rivera, *et al*, 2011), cachaza (Rivera, *et al*, 2011), pollinaza (Rivera, *et al*, 2011), (Córdova, *et al*, 2010) , Suelo (Córdova, *et al*, 2009), Pinzote (Córdova, *et al*, 2009), Pollinaza + Suelo (Córdova, *et al*, 2009), rastrojo de piña (Córdova, *et al*, 2010), dimargon modificado o sistema de producción de *Azotobacter* en estado semisólido (Dibut, *et al*, 2005), kerosén 1 % induce formación de quistes, (Esquivel, *et al*, 2001), melaza, fosfatos y nitratos, (Egas, 2010), que se reportan para más de un tipo de bacteria, entre otros.

Debido a estas razones, se condujo la presente investigación bajo la premisa de identificar los ingredientes inertes que proporcionen el mayor tiempo de sobrevivencia a la bacteria *Azotobacter spp*, sin que repercuta negativamente en su capacidad promotora de crecimiento vegetal.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo General

- Obtener inoculantes de *Azotobacter spp* para promover el crecimiento de lechuga (*Lactuca sativa*) bajo condiciones de laboratorio e invernadero.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Seleccionar bajo condiciones de laboratorio los soportes y/o métodos físicos que brinden mayor período de vida a la bacteria *Azotobacter spp*.
- Determinar en el invernadero la acción promotora para el crecimiento de la lechuga por parte de *Azotobacter spp* mantenida a través del tiempo en diversos soportes.

1.2 Hipótesis

1.2.1 Ho: No se pudo obtener un inoculante que permita expresar el carácter promotor de crecimiento de *Azotobacter spp*.

1.2.2 Ho: Se pudo obtener un inoculante que permita expresar el carácter promotor de crecimiento de *Azotobacter spp*.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Importancia y problemática de la fertilización en la agricultura.

Los fertilizantes sintéticos empezaron a usarse a mediados del siglo XX y rápidamente se fueron convirtiendo en elementos indispensables en los campos agrícolas, debido a su bajo costo y amplia distribución mundial. En la actualidad, se encuentran las explotaciones agrícolas con diferente nivel de deterioro en sus suelos y este nivel depende de la intensidad, frecuencia y duración de las aplicaciones de agroquímicos. Una consecuencia de estos cambios es la contaminación del suelo por el uso creciente de fertilizantes químicos y agroquímicos lo cual es cada día más notorio con el crecimiento de la producción. Esto trae como consecuencia la erosión de los suelos y la disminución del rendimiento de los mismos (Schwenke *et al*, 1997).

Una evidencia de esta condición es la documentada por (Caballero *et al*, 1999) quienes encontraron que las aplicaciones de fertilizantes nitrogenados ocasionan la disminución de la diversidad genética de rizobios en nódulos de fréjol. Este hecho, seguramente influyó en el desbalance biológico de la rizósfera.

Los estudios sobre nutrición de los cultivos ha seguido dos grandes vertientes; una de ellas, la más tradicional en los últimos 60 años, se ha enfocado a la evaluación de los fertilizantes químico sintéticos y la otra, a la exploración de la capacidad que tienen algunos microorganismos para mejorar la nutrición de las plantas y combatir algunos patógenos en el suelo.

Hoy en día se tiene mayor conciencia social sobre la explotación racional de los recursos naturales, al haberse demostrado la importancia de las relaciones entre los organismos. Esta nueva actitud ha favorecido el desarrollo de tecnologías de producción menos contaminantes y ecológicamente más racionales, como el uso de los recursos microbiológicos del suelo en la agricultura (Gregory *et al*, 1994).

Actualmente se utilizan diferentes microorganismos con funciones específicas en la agricultura para mejorar la productividad de las plantas. Todos son una fuente facilitadora del manejo de los nutrientes que benefician el funcionamiento de los cultivos, y forman parte de una tecnología que garantiza una productividad biológica, económica y ecológica más exitosa y sin contaminación del ambiente e inocuidad reducida para el hombre (Aguirre *et al*, 2009).

Una de las alternativas propuestas, es la biofertilización con microorganismos del suelo, la que constituye una tecnología racional que responde a la Agenda 21 de la Conferencia de Río sobre Medio Ambiente y Desarrollo, Naciones Unidas 1992, en lo referente a encontrar sustitutos o mejoras racionales de los procesos de producción que resultan nocivos para el medio ambiente. Desde el punto de vista ecológico, la utilización y/o aplicación correcta de estos microorganismos permite reducir el uso de energía, la degradación del agroecosistema y las pérdidas de nutrientes. En adición, se mantiene la capacidad productiva del sistema, se preserva la biodiversidad y se contribuye con una producción más estable y sostenida a largo plazo, en equilibrio con el entorno (Hernández, I. 2000, Citado por Cabrera, *et al*, 2003).

La biofertilización, es una herramienta biotecnológica que se ha venido utilizando desde hace algunos años para incrementar el rendimiento de los cultivos y disminuir el empleo de fertilizantes de síntesis y agroquímicos. Ejemplo de ello es la aplicación masiva de *Rhizobium* en leguminosas y *Azospirillum* en caña de azúcar. Algunos otros biofertilizantes se encuentran en fase experimental como el empleo de *Azotobacter* en cultivos de arroz, tomate, soya y otros vegetales. Los microorganismos usados como biofertilizantes han incrementado los rendimientos entre 30% y 50% en los cultivos aplicados, manteniendo además los niveles de nitrógeno en los suelos inoculados. (Klibansky, M; González, F. 1996, Citado por Anaya, *et al*, 2005).

2.2 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

2.2.1 Generalidades

Según Mondino (2003) las poblaciones de microorganismos interactúan entre sí y con la planta; estas interacciones pueden ser beneficiosas, neutras o perjudiciales para la planta. Como es sabido, los patógenos interactúan negativamente con la planta produciendo enfermedades. Por el contrario, otros microorganismos interactúan en forma positiva. Algunos ejemplos de acciones benéficas para la planta son: la solubilización de nutrientes, la fijación de nitrógeno, la producción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal y la inducción de resistencia frente a fitopatógenos.

Entre el grupo de microorganismos que interactúan de manera positiva se encuentran las llamadas bacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR por sus siglas en inglés (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), las cuales pueden mejorar la germinación de semillas, el desarrollo de raíces, la utilización del agua por las plantas y absorción de nutrientes; por medio de la producción de los llamados reguladores de crecimiento. (Cattelan *et al*, 1990)

Las PGPR pueden colonizar la rizósfera, o incluso los espacios intercelulares de las plantas; también puede proporcionar protección contra enfermedades víricas, fúngicas, nematodos y bacterias. El uso principal de PGPR en la agricultura es para control biológico de plantas y la biofertilización. (Cattelan *et al*, 1990).

Un número de diferentes bacterias pueden ser consideradas como PGPR, incluyendo especies del genero *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Burkholderia*, and *Bacilli* (Bashan, *et al*, 1990; Brown, 1974; Elmerich, 1984; Kloepper, *et al*, 1988, 1989; Okon *et al*, 1994; Tang *et al*, 1994).

2.2.2 Reguladores de crecimiento.

Los reguladores de crecimiento vegetal o fitohormonas son compuestos orgánicos de bajo peso molecular que actúan a muy bajas concentraciones en sitios distantes de donde son producidos, dentro de la planta interviniendo en muchos procesos fisiológicos (Purves *et al*, 2002; Salisbury, 1994).

El término utilizado para nombrarlas como hormonas vegetales todavía es debatido por algunos autores, puesto que las plantas no poseen un sistema circulatorio análogo al de los animales. Por su naturaleza química, no son proteínas y el hecho de que dichas hormonas estimulan o regulan el crecimiento de la planta, es por lo que muchos botánicos y biólogos se refieren a ellas como reguladores de crecimiento vegetal.

Las siete clases de reguladores de crecimiento vegetal que existen son auxinas, giberelinas, citoquinas, brasinosteroides, ácido abscísico, etileno y ácido jasmónico, los cuales participan en la regulación del crecimiento y desarrollo de la planta. Mientras entre los que inhiben el crecimiento o lo retardan se encuentra el ácido abscísico con una estructura particular y actuando a muy bajas concentraciones dentro de la planta (Kende, *et al*, 1997; Tanimoto 2005).

La actividad de estos reguladores sigue una dinámica de regulación intrínseca y un movimiento dentro de la planta, establecido en base a estudios clásicos desde el sitio de producción y transporte de cada regulador (Tanimoto, 2005).

También se ven implicados regulando el transporte de nutrientes, en sitios donde los nutrientes se elaboran en mayor cantidad de la requerida como de las hojas a puntos donde se utilizan intensamente sin que elaboren la cantidad suficiente, como raíces, flores y frutos en desarrollo (Rojas, *et al*, 1993).

Las fitohormonas se caracterizan por participar en variadas respuestas morfogénicas y de crecimiento de manera pleotrópica, esto quiere decir, que una misma hormona participa en

diferentes procesos y además, que dependiendo de su concentración, la misma hormona puede ser estimuladora o inhibitoria de una misma respuesta. Por otra parte, varias hormonas pueden afectar una misma respuesta, lo cual indica que hay una aparente redundancia en el control de un mismo efecto. Cada respuesta ocurre en un tiempo determinado en el desarrollo de la planta y se presenta solamente en un tejido específico u órgano (Srivastava 2002).

De acuerdo con su estructura y función fisiológica, las hormonas han sido clasificadas en varios grupos que comprenden a las auxinas, citoquininas (CK), ácido abscísico (ABA), giberelinas (GA), etileno, jasmonatos (JA), ácido salicílico (SA), brasinosteroides, poliaminas. En el 2008, dos grupos independientemente identificaron las strigolactonas como un nuevo tipo de hormonas que inhibe la ramificación vegetal (Kamiya, *et al*, 2010).

Durante varias décadas se han desarrollado numerosos estudios para revelar el papel de cada fitohormona, cuyas funciones incluyen una variedad muy amplia de procesos fisiológicos. Se ha dilucidado el rol de las auxinas en procesos de crecimiento, floración, dominancia apical, crecimiento celular de los meristemos y formación de raíces en estaca leñosas; las giberelinas participan en la germinación de semillas e inducen la formación de flores y frutos; por su parte, las citoquininas retardan la caída de la hoja y el envejecimiento e inducen la diferenciación celular y la formación de nuevos tejidos; mientras que el ácido abscísico es responsable del cierre de estomas cuando hay déficit hídrico o inhibe el crecimiento vegetal en momentos de crisis, produciendo una especie de letargo; y por último, el etileno, facilita la maduración de los frutos, la degradación de la clorofila y la posterior caída de las hojas (McSteen, *et al*, 2008).

Gran parte del conocimiento actual obtenido de las respuestas mediadas por hormonas proviene de bioensayos donde se recurre a la aplicación exógena de fitohormonas. Un bioensayo permite medir en una planta o en alguna de sus partes, la respuesta de la misma a un regulador de crecimiento específico. Es uno de los mejores métodos para determinar los rangos de sensibilidad de una planta, ya que se realiza aplicación exógena de la hormona a diferentes concentraciones (Srivastava, 2001).

2.2.2.1 Auxinas

Las auxinas fueron las primeras fitohormonas identificadas y es precisamente el Ácido Indol Acético AIA, la principal auxina endógena en la mayoría de las plantas (Srivastava, 2002). La mayoría de las moléculas que integran este grupo son derivados indólicos, aunque también se encuentran algunos compuestos fenoxiacéticos, benzoicos o picolínicos con actividad auxínica. Las auxinas se encuentran en la planta en mayores cantidades en las partes donde se presentan procesos activos de división celular, lo cual se relaciona con sus funciones fisiológicas asociadas con la elongación de tallos y coleóptilos, formación de raíces adventicias, inducción de floración, diferenciación vascular, algunos tropismos y promoción de la dominancia apical (McSteen, *et al*, 2008).

Dado que los niveles endógenos de auxina son mucho mayores en tejidos jóvenes, es razonable sospechar que éste es su sitio de síntesis; sin embargo, esta hipótesis no ha podido ser probada, debido a que las vías de biosíntesis aún no están completamente entendidas, pues se conocen múltiples y complejas vías de síntesis, algunas dependientes del triptófano y otras independientes de este amino ácido, sin que en la actualidad se haya podido establecer ninguna vía completa de síntesis de auxinas. Por el contrario, se tiene suficiente certeza sobre sus roles fisiológicos, sus vías de señalización y sus mecanismos de transporte, pero aún se desconoce cómo lo produce la planta. En los últimos avances que se han hecho, se han descubierto varios genes claves en la biosíntesis de auxinas, pero aún se requiere integrar estudios genéticos con análisis bioquímicos para llenar los vacíos que subsisten (Zhao, 2010).

En cuanto a los mecanismos de transporte, se conoce un mecanismo polar (más lento) en tallos y raíces, exclusivo de auxinas, que depende de proteínas transportadoras específicas para esta hormona (la familia de transportadores PIN-FORMED) (Klein-Vehn *et al*, 2008), y no polar en el floema (más rápido) donde se encontraría asociado con procesos de división del cambium y

ramificación de raíces. Las auxinas generalmente son transportadas en el sentido del eje longitudinal de la planta, alejándose del punto apical hacia la base (basípeto) en el tallo y en el sentido contrario (acrópeto) desde la raíz (Srivastava, 2002). La importancia del establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular son temas centrales de la biología celular y en la fisiología del crecimiento y desarrollo, ya que esta característica define la dirección de las divisiones celulares, y de esta forma, la arquitectura y forma individual de cada planta, además que está estrechamente relacionada con la dirección de la señalización y la comunicación intercelular (Zazímalová, *et al*, 2007).

2.2.2.2 Citoquininas

Las citoquininas han sido consideradas estructuralmente como derivadas de adeninas o purinas, y dentro de este grupo se incluyen la kinetina, zeatina y benzilaminopurina. Debido a su variación estructural se ha llegado a clasificar en citoquininas isoprenoides y aromáticas (Sakakibara 2006).

Este grupo de fitohormonas es considerado el responsable de los procesos de división celular, entre los que se encuentran la formación y crecimiento de brotes axilares, la germinación de semillas, la maduración de cloroplastos, la diferenciación celular (Klee *et al*, 1991) y también el control de varios procesos vegetales como el retardo de la senescencia y en la transducción de señales (Sakakibara, 2006). Se cree que las citoquininas son sintetizadas en tejidos jóvenes o meristemáticos como ápices radiculares, yemas del tallo, nódulos de raíces de leguminosas, semillas en germinación, especialmente en endospermas líquidos y frutos jóvenes; desde donde se transportan vía xilema hacia la hoja donde se acumula, para luego ser exportada vía floema hacia otros órganos como los frutos (Srivastava, 2002).

Recientemente se han reconocido sus mecanismos de biosíntesis y de señalización, debido al uso de técnicas moleculares modernas que han permitido la identificación de los genes que codifican para las enzimas y proteínas que controlan los puntos clave de estos procesos (Sakakibara, 2006). La biosíntesis y homeostasis de citoquininas, están finamente controladas por factores internos y externos como el nivel de otras fitohormonas y las fuentes de nitrógeno inorgánico, además su mecanismo de translocación está relacionado con el mismo sistema de transporte de purinas y nucleósidos tanto a nivel de toda la planta, como a nivel celular (Sakakibara, 2006).

2.2.2.3 Giberelinas

Las giberelinas son un grupo de diterpenoides que se definen más por su estructura que por su actividad biológica, contrario a lo que ocurre con las auxinas y las citoquininas (Yamaguchi *et al*, 2000).

Las giberelinas biológicamente activas, actúan como reguladores esenciales del desarrollo de las plantas y cubren todos los aspectos de la historia de vida de las plantas, modulando varias respuestas del crecimiento como la germinación de semillas, el crecimiento del tallo, la partenocarpia, la expansión foliar, la elongación de la raíz, la floración y la liberación de enzimas hidrolíticas en algunos tejidos (Ueguchi-Tanaka *et al*, 2007). Únicamente las giberelinas biológicamente activas pueden cumplir con estas funciones, las giberelinas no bioactivas existen en el tejido vegetal como precursores de las formas bioactivas o como metabolitos desactivados. Se ha dilucidado que existe una necesidad estructural como requerimiento para la afinidad con el recientemente descubierto receptor de giberelinas en arroz (GID1) y sus homólogos en otras especies (Nakajima *et al*, 2006). Parece ser que la regulación de la biosíntesis de giberelinas y de sus receptores y vías de señalización dependen de la especie de estudio (Yamaguchi, 2008).

En general, se encuentran mayores niveles de giberelinas en las partes reproductivas en comparación con las vegetativas, y en partes jóvenes en comparación con las maduras. Se encuentra con facilidad en ápices de tallos y raíces, en hojas jóvenes, partes florales, semillas inmaduras y embriones en germinación. Creciente evidencia experimental basada en bioensayos, marcaje radioactivo en diferentes tejidos y patrones de expresión genética en *Arabidopsis*,

sustentan la hipótesis que la biosíntesis de giberelinas ocurre principalmente en partes jóvenes de la planta, mientras que, en tejidos maduros es relativamente deficiente (Srivastava, 2002).

La biosíntesis de giberelinas inicia en los plastidios y el precursor de todo el proceso es el geranilgeranil difosfato (GGDP); existen tres diferentes clases de enzimas necesarias para la síntesis de giberelinas bioactivas en plantas, las terpenos sintasas (TPSs) presentes en los plastidios, las citocromo P450 monooxigenasas (P450Os) ubicadas en el retículo endoplasmático y las dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato (2ODDs) que se encuentran en el citosol (Yamaguchi, 2008). Su transporte se realiza por los tejidos conductores de la planta (Srivastava, 2002), pero aún no se sabe cómo se realiza su movimiento en las plantas (Ueguchi-Tanaka *et al*, 2007).

2.2.2.4 Ácido Abscísico

El ácido abscísico ABA es un sesquiterpenoide particularmente importante en la respuesta a estrés y desempeña un papel importante en procesos fisiológicos, cuyos efectos varían dependiendo del tejido y estado de desarrollo de la planta. Entre sus múltiples funciones, se incluye la inducción de síntesis de proteínas LEA (Late Embriogenesis Abundant), con lo cual se promueve la tolerancia del embrión a la deshidratación y acumulación de proteínas de almacenamiento. Además se le atribuye el mantenimiento de la dormancia de semillas; en hipocótilos, epicótilos y coleóptilos inhibe el crecimiento y elongación; y en hojas promueve su senescencia (Finkelstein *et al*, 2008). Se ha reconocido su antagonismo a diversos efectos de las giberelinas, incluyendo la promoción del crecimiento en plántulas y la síntesis de α -amilasa (Cutler *et al*, 2010), cumple un papel importante en la regulación de las relaciones hídricas, por su relación determinante en la respuesta de las células guarda estomáticas y en el mantenimiento del crecimiento radical durante el déficit hídrico, lo cual se encuentra ampliamente estudiado y documentado en la actualidad (Kim *et al*, 2010).

En general, se considera un antagonista de las hormonas de crecimiento como auxinas, giberelinas o citoquininas. Es considerada la hormona del estrés, ya que su síntesis se ve favorecida en condiciones adversas para la planta. Es una fitohormona ubicua en plantas vasculares, cuyo movimiento lento y no polar ocurre en condiciones normales por los haces vasculares y en todas las direcciones. En condiciones de estrés hídrico el ABA aumenta su transporte desde la raíz a las hojas, donde con el cambio de pH se redirige principalmente hacia las células oclusivas de los estomas para facilitar el cierre de estas estructuras y evitar mayor transpiración y pérdida de agua (Klee *et al*, 1991; Srivastava 2002).

Recientemente, se ha encontrado que el ABA afecta las respuestas vegetales frente a patógenos, mediante la promoción de resistencias que van desde impedir la entrada al patógeno por vía estomática, hasta incrementar la susceptibilidad interfiriendo con las respuestas de defensa del sistema inmune vegetal en el que pueden interrelacionarse otras hormonas (Cutler *et al*, 2010).

En la actualidad y como producto del estudio durante los últimos treinta años, se han logrado identificar más de 100 loci y numerosos mensajeros secundarios implicados en la señalización del ABA, incluyendo el papel del calcio, de las especies reactivas de oxígeno (ROS), de los nucleótidos cíclicos y de algunos fosfolípidos (Nambara *et al*, 2005).

2.2.2.5 Etileno

El etileno es un gas incoloro, es una molécula orgánica con actividad biológica, producida por todas las plantas, algunos hongos, levaduras y bacterias (Srivastava, 2002).

Su biosíntesis se incrementa en plantas sometidas a estrés y se asocia con procesos de senescencia y maduración. Dentro de sus funciones fisiológicas más investigadas, se encuentran las relacionadas con la abscisión de hojas, marchitamiento de flores, maduración de frutos y otros procesos relacionados con el envejecimiento, pues se plantea su participación en la degradación de clorofila y peroxidación de lípidos de membranas. También favorece la epinastia de hojas, la germinación de semillas, pone fin a la dormancia de brotes y promueve la síntesis de enzimas

relacionadas con defensa a patógenos, daños mecánicos o en situaciones de estrés, entre otros (Santner *et al*, 2009).

Esencialmente se produce en todas las partes de la planta, se transporta de célula a célula difundándose en el citoplasma, ya que es suficientemente hidrosoluble para ser transportado en solución. Por regla general, el sitio de acción del etileno es próximo al sitio de síntesis (Klee *et al*, 1991).

La vía de biosíntesis del etileno se ha venido esclareciendo desde la década de los setenta del siglo XX y en el modelo actual se ha llegado a comprobar que esta hormona es sintetizada a partir de metionina en tres pasos, de los cuales se conocen claramente los productos alternativos y las enzimas implicadas en el proceso y por lo tanto, la regulación del mismo; adicionalmente, la biosíntesis inducida de etileno y su subsecuente señalización intracelular dentro de una única y conservada vía ha sido bien caracterizada en la actualidad. Sin embargo, aún hay algunos retos por abordar, como la comprensión total de los pasos que suceden entre la recepción de la señal patogénica y la biosíntesis de etileno y las vías comunes que comparte esta hormona con jasmonatos y ácido salicílico (Alonso *et al*, 2004).

2.2.2.6 Jasmonatos

Los jasmonatos JA, incluyen el ácido jasmónico, sus ésteres y otros metabolitos intermedios. Son ciclopentanonas cuyos niveles se incrementan rápidamente en respuesta a perturbaciones mecánicas, ataques de insectos o infecciones por patógenos. Se ha demostrado el papel de los jasmonatos como mecanismos de defensa a plagas, patógenos y estrés abiótico, así como también su participación en la formación de zarcillos, maduración de semillas, producción de polen y crecimiento de raíces, entre otros (Srivastava, 2002). Regulan la respuesta de defensa frente a estrés hídrico, radiación UV y ozono, entre otros tipos de estrés, además están involucrados en mecanismos de transducción, desarrollo reproductivo, senescencia y partición del carbono y a partir del estudio de mutantes se ha podido dilucidar su papel en la maduración del polen y de los estambres (Browse *et al*, 2008).

La vía de biosíntesis de jasmonatos a partir del ácido α -linolénico fue propuesta por primera vez por Vick y Zimmerman en 1983 y desde entonces, todos los estudios posteriores han confirmado los procesos bioquímicos sugeridos y han adicionado importantes detalles acerca de la enzimología, regulación y localización subcelular de la cadena de reacciones (Browse, 2009). A partir de mutantes de *Arabidopsis* se ha podido esclarecer la vía de biosíntesis de la forma activa de la hormona (jasmonoil-isoleucina, JA-Ile) y se ha comprobado su requerimiento en la supervivencia de plantas atacadas por insectos y patógenos, así como en la fertilidad de la misma; también se conocen los promotores y represores en su vía de señalización, gracias a perfiles transcripcionales, pero a pesar de los enormes esfuerzos que se han hecho en la identificación del receptor de JA y su mecanismo de acción, éste aún permanece sin ser identificado (Browse, 2009).

La acción hormonal de los jasmonatos está integrada en procesos de señalización corriente arriba y corriente abajo, que incluyen la interacción con otras hormonas, con proteínas mitogénicamente activadas (MAP), cascadas de quinasas, enzimas fosfatasa y sistemas de calcio/calmodulina (Howe *et al*, 2008).

2.2.2.7 Ácido salicílico

El ácido salicílico es un compuesto fenólico presente en todos los órganos vegetales. Tiene impacto significativo tanto en el desarrollo y crecimiento de la planta, como en los procesos de fotosíntesis y transpiración ya que está relacionado con la toma y transporte de iones, así como con, la estructura de los cloroplastos y la anatomía de la hoja. Por otra parte, se le ha asignado una fuerte responsabilidad como señal endógena en la resistencia a patógenos y en la Resistencia Sistémica Adquirida SAR (Santner *et al*, 2009).

Mucho se ha aprendido durante las dos últimas décadas, acerca de cómo es generada, regulada y traducida la señal de ácido salicílico (SA) para dar origen a la muerte celular producida por la respuesta hipersensible (HR), la expresión de genes de defensa y/o la SAR. Una de las preguntas que actualmente orienta las diferentes investigaciones es el conocimiento de cómo es percibida inicialmente esta molécula por la planta y cómo este reconocimiento dirige los eventos de señalización de los mecanismos de defensa, hasta el momento se han caracterizado cuatro proteínas que se unen a SA; sin embargo, ninguna de ellas es el receptor de esta hormona (Vlot *et al*, 2009).

Aunque está bien establecido que se requiere acumulación de ácido salicílico en los tejidos sistémicos localizados, para inducir una respuesta inmune tipo SAR, muchos de los componentes de la señalización y cómo cooperan para inducir la respuesta permanecen aún desconocidos o pobremente caracterizados (Vlot *et al*, 2009).

2.2.2.8 Brasinoesteroides

La familia de los brasinoesteroides (BRs) está constituida por polihidroxi-esteroides ubicuos en los tejidos vegetales; sus funciones se relacionan positivamente con la elongación y división celular en tallos, el desarrollo de tubo polínico, la diferenciación del xilema y el desenrollamiento de las hojas. Fueron descubiertos a partir de extractos de polen, en los que se observaban compuestos activos con propiedades similares a las giberelinas, pero que se diferenciaban de estas en cuanto a los patrones de crecimiento y curvatura de tallos. Los más comunes en plantas superiores son castasterona y brasinólida (Srivastava, 2002).

Está comprobado e incluido en el modelo actual de las vías de señalización de brasinoesteroides que el primer receptor de brasinoesteroides es una kinasa que se encuentra embebida en la membrana plasmática (BRI1), para la cual se ha determinado cada uno de sus dominios, secuencia, regulación, etc.; posterior a la percepción se inicia una cascada de señales que incluyen un conjunto de segundos mensajeros los cuales se encuentran identificados y reconocida su función en la modulación de la respuesta genómica (Vert *et al*, 2005; Kim, TW, *et al*, 2010).

Se han identificado las enzimas y genes comprometidos en la biosíntesis, así como los puntos de regulación (Fujioka *et al*, 2003). En la actualidad está pendiente dilucidar el papel de los factores que determinan la homeostasis de los brasinoesteroides, dónde y cuándo son sintetizados y cómo ocurre su distribución en la planta (Kim, TW, *et al*, 2010).

Se han reportado enormes progresos en el entendimiento de la biosíntesis, la función, el metabolismo, el transporte y las señales de transducción de los diferentes tipos de hormonas, evidenciando estrategias comunes usadas para transmitir las diferentes señales hormonales (Kamiya, 2010).

Finalmente, es importante tener en cuenta que el crecimiento y desarrollo de las plantas está regulado por un equilibrio entre las hormonas estimulantes del crecimiento (auxinas, giberelinas, citoquininas y brasinoesteroides) y las hormonas inhibitoras del crecimiento (ácido abscísico, etileno y jasmonatos).

2.3 Rizósfera

2.3.1 Importancia

La Rizósfera es la zona del suelo que rodea a una raíz de la planta, donde la parte orgánica e inorgánica de los suelos están influenciados por la raíz. Esta zona es de aproximadamente 1 mm de ancho, pero no tiene clara ventaja, más bien, es un área de actividad biológica y química intensa, influencia por compuestos exudados por la raíz, y por microorganismos que se alimentan de los compuestos. (Beneduzi *et al*, 2011)

La rizósfera se caracteriza por presentar una alta concentración de nutrientes en comparación con el resto del suelo en respuesta a la presencia de compuestos liberados por las plantas (Rovira, 1973). En este ambiente se desarrollan microorganismos en cantidades muy superiores a las encontradas

en el resto del suelo, muchos de los cuales presentan características de promoción del crecimiento vegetal que son deseables para el logro de cultivos de alta productividad. Los mecanismos que explicarían las respuestas en desarrollo y producción de los cultivos a la inoculación con rizobacterias pueden ser directos al favorecer a las plantas mejorando su nivel de nutrición (incluyendo la disponibilidad de agua), facilitar la disponibilidad de nutrientes o incrementar la superficie de absorción de las raíces. También, los mecanismos descritos en relación a la actividad de rizobacterias pueden ser indirectos a través de la interacción con otros microorganismos de manera tal de facilitar el normal desarrollo de las plantas (Dobbelaere *et al*, 2003).

Uno de los problemas en la agricultura es el desconocimiento de las especies presentes en los agroecosistemas y en la rizósfera de los cultivos. Desde el punto de vista ecológico, para la utilización de biofertilizantes, es importante conocer los integrantes de la comunidad bacteriana que favorecen su aplicación como inoculantes y propician un efecto agrobiológico positivo en los cultivos agrícolas.

En los últimos años, los biofertilizantes son un importante componente integrado del sistema de suministro de nutrientes como una gran promesa para mejorar el rendimiento de los cultivos a través de mejores suministros de nutrientes en el medio ambiente; sin embargo, la aplicación de fertilizantes microbianos, de alguna manera, no ha logrado constantes efectos. (Alfonso, *et al*, 2005).

Los estudios microbiológicos elaborados en plantas indican que algunas mezclas de bacterias permiten que interactúen unas con otras sinérgicamente, proporcionando nutrientes, eliminación de productos inhibidores, e impulsando actividades físicas o bioquímicas que puedan mejorar algunos aspectos beneficiosos de su fisiología, al igual que la fijación de nitrógeno. (Siddiqui, 2006)

2.4 Bacteria *Azotobacter* spp.

2.4.1 Clasificación del género *Azotobacter*

Tchan (1984) LPSN (2013).

Dominio	Bacteria
Phylum BXII	Proteobacteria
Clase III	Gamaproteobacteria
Orden IX	Pseudomonadales
Familia I	Pseudomonadaceae
Género III	<i>Azotobacter</i>

2.4.2 Generalidades del género *Azotobacter*

La familia Pseudomonadaceae (*Azotobacteraceae*) agrupa a las eubacterias Gram negativas, con pared celular compleja, que consiste de una membrana interna y otra externa. La interna está integrada por peptidoglucano que contiene ácido murámico y mureína. Estas bacterias son quimioheterótrofas, aerobias estrictas, capaces de fijar nitrógeno molecular y generar sustancias promotoras de crecimiento vegetal (Tchan, 1984; Pandey, *et al*, 1990). Sus hábitats naturales son los suelos, las aguas o la rizósfera. Se divide en dos géneros: *Azotobacter* capaz de formar quistes y *Azomonas* que no los forma. (Totorá, *et al*, 2007)

Se reproducen por fisión binaria, viven en suelos y en aguas frescas, son células ovoides grandes de 1.5 a 2.0 µm de diámetro. Son pleomórficas, variando su morfología desde bacilos hasta células en forma de cocos. Se les observa como células individuales, como pares o formando agregados

irregulares, y algunas veces formando cadenas de tamaño variable. Algunas especies como *A. vinelandii* y *A. chroococcum* sufren un proceso de diferenciación para formar quistes resistentes a la desecación (Esquivel, *et al*, 2001). La formación de quistes ha sido muy estudiada. Es un fenómeno que se produce ante condiciones ambientales adversas y en el laboratorio puede inducirse pasando el cultivo de un medio con glucosa a uno con b-hidroxibutirato como única fuente de carbono (Lin, 1968). Las proteínas específicas del enquistamiento se producen a expensas de proteínas no esenciales (Ruppen, *et al*, 1983; Orville, *et al*, 1961) en un proceso secuencial.

Se mueven por flagelos peritricos, son aerobias, pero pueden crecer en bajas concentraciones de oxígeno. Algunas cepas producen pigmentos solubles o insolubles en agua. Utilizan azúcares, alcoholes y sales inorgánicas para crecer.

Son fijadoras de nitrógeno; en vida libre fijan al menos 10 mg de N₂ por gramo de carbohidrato (glucosa) consumido. Requieren molibdeno para fijar nitrógeno que puede ser parcialmente reemplazado por vanadio (Espín, 2004). Utilizan nitrato y sales de amonio y ciertos aminoácidos como fuentes de nitrógeno. Son catalasa positiva. El rango de pH en el que crecen en presencia de nitrógeno combinado es 4.8-8.5 el pH óptimo para crecer cuando fijan nitrógeno es 7.0-7.5, requieren una temperatura óptima de 30°C, susceptibles a pH ácido altas concentraciones de NaCl y temperaturas mayores a 35°C (Saribay, 2003).

2.4.3 Especies de *Azotobacter*

El género *Azotobacter* fue descrito por (Beijerinck 1901) y en la actualidad incluye seis especies: *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. beijerinckii*, *A. nigricans*, *A. armeniacus* y *A. paspali*

2.4.4 Importancia aplicada

Diversas especies del género *Azotobacter*, producen una serie de sustancias de interés biotecnológico: alginatos, poli-b-hidroxibutirato, pigmentos y hormonas vegetales (González, *et al*, 1986).

El Oxígeno es un factor limitante en la fijación de nitrógeno debido a que suprime el complejo nitrogenasa, *Azotobacter* supera este problema debido a que tiene la tasa más alta de respiración de cualquier organismo, manteniendo así un bajo nivel de oxígeno en sus células, aspecto importante en la elección como promotor de crecimiento. (Gnanamanickman, 2006 citado por Ngoma. *et al*, 2012)

La utilización de *Azotobacter* como fertilizante se ha discutido ampliamente. En algunos tipos de cultivo parece haber dado resultados positivos, como en la patata, caña de azúcar, remolacha, maíz, sorgo, tomate y otros (Saric, *et al*, 1990).

En cebada se ha comprobado que su utilización reduce el uso o dependencia de fertilización química, por destacarse del control, debido a los promotores de crecimiento que emite la bacteria (Rojas, *et al*, 2013). En el pimentón Álvarez, *et al*, (2008), comprobaron que la inoculación aumentó la germinación y el peso seco con todas las cepas evaluadas y el porcentaje de N con la mayoría de ellas, mientras que todas las cepas indujeron una disminución del P foliar para el momento del muestreo. En trigo se encontró que al comparar fertilización mineral (dosis), biológica (cepas *Azotobacter*, *Pseudomonas*), con un testigo absoluto, después de la mayor dosis mineral, se destaca como segundo mejor rendimiento la fertilización mineral y biológica, en especial la combinación de *Azotobacter* con *Pseudomonas*. (Moradi, *et al*, 2011). Con plántulas de papaya incrementó los porcentajes de emergencia y germinación (Álvarez, *et al*, 2011).

En Ecuador se ha utilizado *Azotobacter* de manera destacada en cultivos como Frejol (Caicedo, 2010), (Vásquez 2011), Lechuga (Vélez, 2010).

2.5 Biofertilizantes inoculante bacteriano

Según Bashan, (1998) "Inoculante bacteriano" – Es la formulación que contiene una o más cepas bacterianas beneficiosas (o especies) en un soporte base, fácil de usar y económico, que puede ser inorgánico, orgánico, o sintetizarse de moléculas definidas.

El inoculante es el medio de transporte bacteriano de la fábrica a la planta viva. Los efectos deseados del inoculante en el crecimiento de plantas puede incluir la fijación de nitrógeno en leguminosas, biocontrol principalmente en enfermedades del suelo, la mejora de la absorción de minerales, la meteorización de los minerales del suelo, y efectos nutricionales u hormonales.

"Biofertilizante" - un término engañoso, utilizado ampliamente que significa "inoculante bacteriano". Por lo general, se refiere a preparaciones de microorganismo o microorganismos que puede ser un sustituto parcial o completo para la fertilización química (Kloepper, 1994) (como inoculantes de rizobios). Sin embargo, otros efectos de bacterias en crecimiento de las plantas son ignorados. La razón para usar la palabra "fertilizante" es que en algunos países se facilita el registro de uso con fines comerciales. Este término, aunque es apropiado para rizobios, debe ser abandonado.

Según, Abela *et al*, (2006) las disposiciones del MERCOSUR/GMC/RES No 28/98 en su artículo 4 para el comercio de biofertilizantes definen, Inoculante como “todo producto que contenga microorganismos con acción estimulante sobre el crecimiento de las plantas”.

También, Moreno *et al*, (2006) lo menciona como “Producto elaborado con base en una o más cepas de microorganismos benéficos que, al aplicarse al suelo o a las semillas, promueve el crecimiento vegetal o favorece el aprovechamiento de los nutrientes en asociación con la planta o su rizósfera tales como micorrizas, rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal como los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Frankia*, y *Beijerinckia*.

Biofertilizante se define como una preparación conteniendo células vivas o latentes de cepas eficientes de microorganismos que aplicados al suelo o a la semilla por sus interacciones en la rizosfera facilita el consumo de nutrientes. Aceleran procesos microbianos en el suelo que aumentan la extensión de la disponibilidad de nutrientes en una forma fácilmente asimilable por las plantas. (Somasegaran, *et al*, 1994).

Para Loredó *et al*, (2004) La información sobre la manipulación de las PGPR, a través de inóculos, para la promoción del crecimiento de las plantas en condiciones de campo es inconsistente y no siempre favorable, a diferencia de los experimentos realizados en condiciones de laboratorio e invernadero. Por esta razón, se requieren de mayores estudios sobre el comportamiento de las bacterias inoculadas en condiciones de campo, para conocer los factores ambientales, como tipo de suelo y clima que influyen en colonización satisfactoria de la raíz y que determina su efecto en el desarrollo del cultivo.

En Argentina, Corvalán *et al*, (2006) menciona que los biofertilizantes, además, deben ser considerados como una “inversión ambiental” altamente rentable.

Del soporte se menciona es el vehículo de suministro de microorganismos vivos desde la producción hasta el campo. (Trevors *et al*, 1992.). El portador es la mayor parte (por volumen o peso) del inoculante.

Los materiales de los que está compuesto el portador o soporte y el tipo de formulación varía. El vehículo puede ser una suspensión o un polvo. Un buen soporte debe tener una característica esencial: la capacidad de producir la cantidad adecuada de células viables en buen estado fisiológico en el momento adecuado (Bashan, 1986, Bashan *et al*, 1990; Fages, 1990, 1992 Citado por Bashan, 1998) (Smith, 1992; Trevors *et al*, 1992).

2.5.1 Características deseables de un inoculante bacteriano.

Las características deseables en un inoculante bacteriano, (Bashan, 1998), (Somasegaran, *et al*, 1994), se pueden enumerar en:

- Características químicas y físicas. Los inoculantes debe ser casi estériles o esterilizados fácilmente, y tanto química como físicamente tengan la mayor uniformidad posible. También deben ser de buena calidad, con alta capacidad de retención de agua y adecuado para una variedad de especies y cepas bacterianas.
- Cualidades de Manufactura. El inoculante debe ser fácil de fabricar y mezclado con insumos existentes de la industria, debe permitir la adición de nutrientes, con un pH fácilmente ajustable, y estar hecho de un material en bruto a un precio razonable en cantidad adecuada.
- Cualidades de manejo. Un inoculante bueno permite la facilidad de manipulación (una preocupación importante para el agricultor), proporciona una liberación rápida y controlada de las bacterias en el suelo, y se puede aplicar con maquinaria estándar.
- Las características ambientales. El inoculante debe ser no tóxico, biodegradable y no contaminante, y minimizar los riesgos para el medio ambiente tales como la dispersión de las células a la atmósfera o al agua del suelo.
- Cualidades de almacenamiento. El inoculante debe tener vida útil suficiente (uno o dos años a temperatura ambiente a menudo es necesario para una buena integración en el sistema de distribución agrícola en algunos países).

Un "súper-inoculante" tal como el descrito anteriormente es teóricamente imposible. A la fecha, ningún esfuerzo para sintetizar un vehículo con características superiores a las predefinidas se ha informado, probablemente debido a los costos involucrados. Las materias primas de la mayoría de los productos comerciales son baratos y naturalmente abundantes (turba y fracciones de suelo). Somasegaran, *et al*, (1994).

2.5.2 Portador

El portador casi universal para rizobios (que es el único inoculante que se venden en gran volumen hoy) es la turba (Bernal *et al*, 2004; Gili *et al*, 1999; Acuña *et al*, 1996; Ruíz *et al*, 1979). A pesar de su popularidad, tiene varias desventajas y muchos materiales alternativos se han evaluado como portadores, los cuales se pueden dividir en cuatro categorías básicas:

- Los suelos: turba, carbón, arcillas, y suciedad inorgánica (Bernal *et al*, 2004; Daza, *et al*, 2000; Smith, R. 1995; Smith, R. 1992.)
- Materiales de residuos: Residuos Agroindustriales (Peñafiel, A. 2006; Dayana, S. 2007); Compost (Chen, J. 2006);
- Materiales inertes: Alginato (Trevors *et al*, 1992); Vermiculita (Gandhi *et al*, 2010). Liofilización.

2.5.3 Formulación

Bashan (1998) La formulación es crucial para los inoculantes que contienen una cepa bacteriana eficaz debido a que determina el éxito o el fracaso de un agente biológico. La formulación es para

la industria el "arte" de convertir una prometedora bacteria evaluada en laboratorio en un producto de ámbito comercial.

Las Formulaciones químicas de agro productos deben establecer altos estándares de larga vida útil, facilidad de manejo, y la resistencia al uso por parte de los agricultores. Para las formulaciones de inoculantes microbianos se espera que se igualen a las características anteriores y superen los dos problemas más importantes para los organismos vivos.

- La pérdida de viabilidad durante el almacenamiento en el almacén del agricultor (que en los países en desarrollo suelen carecer de refrigeración), y
- la larga vida útil y estabilidad en todo el rango de -5° a 30° C dentro de los sistemas de distribución comercial. Productos que no tienen este intervalo de tolerancia de la temperatura será inaceptable en el mercado agrícola (Kenney, 1997).

(Álvarez *et al*, 2008) Para la selección de bioinóculos debe considerarse el cultivo y las condiciones de fertilidad de los suelos donde se intenten aplicar.

Formas de dispersión.

Las formas básicas de dispersión de los inoculantes microbianos que se conocen son:

- Polvo.- Esta forma se utiliza como un revestimiento de las semillas antes de la siembra. Cuanto menor sea el tamaño de partícula, mejor es el inoculante se adherirá a las semillas. Los tamaños estándar varían desde 0,075 hasta 0,25 mm y la cantidad de inoculante utilizado es de alrededor de 200 a 300 g/ha. Estos inoculantes son los más comunes, tanto en los países desarrollados y los países en desarrollo (Tang *et al*, 1997).
- Lodos.- Este inoculante se basa en inoculantes de tipo de polvo suspendidos en el líquido (normalmente agua). La suspensión se aplica directamente en el surco o, alternativamente, las semillas se sumergen inmediatamente antes de la siembra.
- Granulados.- Estos inoculantes son aplicados directamente sobre el surco junto con las semillas. El tamaño varía son 0,35 a 1,18 mm. Para inoculante de rizobio se utiliza a un volumen de 5 a 30 kg / ha. Estos inoculantes son populares y se han comercializado con éxito desde 1975 (Tang *et al*, 1997). Existe últimamente como variante de este tipo los granulados sintéticos en forma de perlas. Estos pueden ser en tamaños macro (1 a 3 mm de diámetro) que se utiliza como forma de gránulos, o en tamaño micro (100 a 200 μ m) usado como un polvo para el recubrimiento de semillas. Estos inoculantes son una nueva y todavía sin probar tecnología de inoculación.
- Líquidos.- Estos inoculantes se obtiene de caldos de cultivo o formulaciones líquidas, principalmente en agua, pero también en aceites minerales u orgánicos. Las semillas o bien se sumergen en el inoculante antes de la siembra, o con un aplicador uniformemente rocía el inoculante líquido en las semillas. Después del secado, las semillas se siembran. Estos inoculantes son actualmente muy populares en los EE.UU, Canadá, Argentina y Brasil, principalmente para la soja, pero también para las lentejas, los guisantes y maní (RS Smith, 1995, comunicación personal citado por Bashan, Y 1998).

Para los agentes de control biológico de enfermedades de la hoja, el inoculante se puede diluir en agua y se pulveriza para una mejor cobertura de las hojas Alternativamente, la suspensión se puede pulverizar directamente en el surco o en las semillas antes de la siembra. El inoculante en el surco proporciona una mayor cantidad de las bacterias a la planta de inoculación de la semilla. En rizobios, esto mejora la nodulación de la planta (Smith, 1995). Para las bacterias con una pobre supervivencia en el suelo, como *Azospirillum* sp. (Bashan *et al*, 1995), estas formulaciones son en gran medida inútil, ya que no proporcionan un entorno protector para las bacterias. Además, en

algunas especies de plantas, estas formulaciones se deben aplicar varios días después de la siembra en germinación de plántulas, haciendo un trabajo extra y elevando el costo para el agricultor.

El uso de cada tipo de inoculante depende de disponibilidad en el mercado, el costo y las necesidades de un cultivo particular bajo condiciones ambientales específicas. Por ejemplo, la forma granular es mejor que los inoculantes en polvo para rizobios, bajo condiciones de plantación estresantes, pero puesto que se requiere más, es más costoso (Smith, 1992).

Inoculantes microbianos han sido incorporados en las prácticas de campo en todo el mundo, con resultados satisfactorios, especialmente para los rizobios. En comparación con las aplicaciones químicas en la agricultura, su impacto sobre el mercado es pequeño. Sin embargo, la industria agroquímica es más comprensiva ahora al concepto de bacterias inoculantes de lo que ha sido anteriormente. Hay un interés genuino en el desarrollo de productos bacterianos que sean fiables y que puedan actuar como complemento a los productos químicos que ya están en el mercado (Bashan, 1998).

El mercado dicta que el inoculante debe ser lo más barato posible. Los gastos en el desarrollo de nuevos materiales inoculantes mueve rápidamente el precio para la agricultura, especialmente en los países en desarrollo. Sin embargo, existen varios mercados de alto valor de especialidad tales como flores, frescas frutas y verduras orgánicas, donde los químicos son indeseables o llega a ser difícil de usar debido a restricciones.

Los cultivos de invernadero son también objetivos primarios para los inoculantes comerciales. Puesto que son a menudo cultivados en suelos desinfectados o incluso sin suelo, pero con altos costos de los insumos, los costos de la inoculación adicional no producirán una carga económica inaceptable para el productor. Al mismo tiempo, este tipo de cultivo evita todas las dificultades que se originan a partir de la interacción de los inoculantes con el suelo (Fages, 1995 comunicación personal, citado por Bashan 1998). Por lo tanto, estos mercados, si se desarrollan adecuadamente, pueden representar una oportunidad novedosas para que los inoculantes PGPR.

(Bashan 1998) Desde una perspectiva realista, hay que aceptar que en el futuro previsible, los productos químicos siguen dominando el mercado. Sólo es de esperar un aumento gradual y modesto en el uso de inoculantes bacterianos.

La agricultura en los países desarrollados es sin duda el principal promotor de los microbios inoculantes que son "ambientalmente amigables". Sin embargo, se debe prestar especial atención a la necesidades y limitaciones de los países en desarrollo que necesitan formulaciones fáciles de usar y económicas.

Para el futuro a corto y medio plazo, la investigación debe centrarse en el desarrollo de posibles portadores de una mejor calidad y más económicos

2.5.4 Normas de calidad

Indica Corvalán *et al.* (2006) Que las normativas vigentes (Resolución 310-94.ARGENTINA) establecen como requisitos mínimos de concentración a la elaboración de 1000 millones de UFC.g o ml⁻¹ y de 100 millones de UFC x g⁻¹ o ml⁻¹ al vencimiento, obligando además que los biofertilizantes suministren al vencimiento un número de bacterias viables mínimo, que es de 80 mil para semillas tamaño soja y de 1000 para semillas tamaño alfalfa. Sin embargo, no están establecidos ni descritos los métodos para realizar el control de calidad de estos parámetros además de la pureza del producto en cuanto a la presencia de microorganismos contaminantes

Naturalmente, un inoculante debe contener un nivel suficiente de bacterias para inocular plantas y producir una ganancia económica. El nivel requerido de bacterias no se puede establecer como un

estándar general ya que varía de una especie bacteriana a otra. Sólo los inoculantes de rizobios tienen legalmente establecido estándares.

Como se trata de un nuevo campo de investigación, las normas para los números de PGPR en inoculantes todavía no existen, y cada fabricante puede alegar lo que considere apropiado para su producto. De hecho, algunas preparaciones comerciales incluso no contiene células viables.

Muchos países desarrollados (pero no de los EE.UU.) tienen regulaciones para la calidad del inoculante, pero en casi todos los países de América Latina, la calidad del inoculante no está regulado, ni las regulaciones existentes hacen cumplir. El nivel requerido de rhizobia en el inoculante varía en todo el mundo (entre 10^7 y 4×10^9 UFC / g de inoculante) y no existe un conjunto de normas internacionales comunes (Corvalán *et al*, 2006)

En, "Agriculture Canada" es la única agencia gubernamental en América del Norte que tiene continuamente inoculantes regulados durante los últimos 20 años. Esto fue después de una investigación interna por "Agriculture Canada" durante la década de 1970 que se encuentran bajos niveles de *Rhizobium* en preparados comerciales (Catroux *et al*, 2001). Los últimos estándares en Canadá para rizobios son 10^3 a 10^5 rizobios por semilla nodulante (Dependiente del tamaño) o 10^{11} , rhizobia por hectárea (Bordeleau *et al*, 1981).

El soporte es la mayor porción del inoculo y debe poseer una característica esencial: la capacidad de mantener un número alto (10^6 a 10^7 UFC x g⁻¹), viable de microorganismos en el momento de la inoculación y durante su establecimiento en el suelo. (Bashan, 1998)

Según Cepeda, (2008) la concentración de biomasa alcanzada por los tres biofertilizantes: PKM, JCP y JCM producidos fue de: 6.31×10^{12} UFC/ml, 6.9×10^8 UFC x g⁻¹ y 6.76×10^8 UFC x g⁻¹, respectivamente, considerándose concentraciones óptimas para su uso como inóculos.

Los métodos de control de calidad para determinar el número de bacterias en el inoculante no están estandarizados, (Lindahl *et al*, 1995), los métodos comúnmente conocidos en microbiología es el recuento en placa, número más probable MPN (Woomer, P. 1994). ELISA e inmunotransferencia (Le Blay *et al*, 2004).

2.5.5 Tiempo y métodos de aplicación de inoculantes

Álvarez *et al* (2011) La doble biofertilización esto es, en semilla y plántula, estimuló el crecimiento y biomasa de las plántulas en comparación a la simple biofertilización.

Menciona Abela *et al* (2006) que en general, las formulaciones en el mercado son en polvo usando turbas arcillosas o turbas netamente orgánicas Carex o Sphagnum esterilizadas ya sea por calor húmedo o radiación como soporte para los microorganismos y como adherente azúcar u otros productos químicos cuya inocuidad sobre los microorganismos fue previamente establecida.

Existen también en el mercado boliviano formulaciones líquidas que emplean las tecnologías de fermentación y estabilización celular desarrolladas en Argentina. Estas formulaciones pueden tener incorporadas substancias promotoras y/o protectoras de la bacteria o estos compuestos son vendidos como productos aparte a ser mezclado al momento de la siembra. En cada caso las instrucciones para el mantenimiento, aplicación y uso de los biofertilizantes estarán debidamente descritas en los distintos empaques.

2.6 Cultivo de Lechuga

2.6.1 Clasificación Taxonómica

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Asteridae
Orden:	Asterales
Familia:	Compositae
Subfamilia:	Cichorioideae
Tribu:	Lactuceae
Subtribu:	Lactucinae
Género:	Lactuca
Especie:	sativa-linnaeus
Cultivar:	Green Salad Bowl
Nombre científico:	<i>Lactuca sativa</i> L.

2.6.2 Origen

La lechuga *Lactuca sativa* L. es originaria de las costas del sur y sureste del Mar Mediterráneo, desde Egipto hasta Asia Menor.

Los egipcios la comenzaron a cultivar 4500 años antes de la era cristiana y se supone que la utilizaban para extraer semilla y para forraje. En pinturas encontradas en tumbas egipcias aparecen plantas que asemejan a lechugas cos o romanas, con hojas alargadas terminadas en punta.

De Egipto pasó a Grecia, ya que es mencionada en los escritos de Sócrates (450 a.C.), Aristóteles (356 a.C.), Teofrasto (332 a.C.) y Dioscórides (60 a.C.). La lechuga fue muy cultivada también por los romanos, quienes rápidamente la difundieron por toda Europa y llegó a América en Island, de las Bahamas, solo dos años después de Colón. Se considera que la lechuga en esa época era la de tipo cos o bien la de hoja.

En Sudamérica se tiene referencia sobre el cultivo en 1950 en Brasil.

2.6.3 Distribución Geográfica

Se desarrolla actualmente en todo el mundo a manera de cultivo asistido, no se registra su permanencia de manera natural, debido a su domesticación.

2.6.4 Importancia Económica

Se la utiliza en forma general como un producto de consumo humano, aunque recientes estudios reflejan su importancia en la manipulación genética, desarrollando por ejemplo plantas con alto contenido de ácido fólico (Nunes, 2009).

Características morfológicas de la especie (Suquilanda, M. 2003; Escaff, M. 2001; Salisbury, F. 1994; Mallar, A. 1978; Angles, J. 1977.)

2.6.5 Descripción de la planta

Raíz

Esta es pivotante, presenta un eje principal carnosos, poco ramificado, con abundante látex, pudiendo llegar hasta 1.80 m de profundidad, con gran cantidad de rizomas desarrollados a nivel superficial del suelo (en los primeros 30 cm).

Tallo

De acuerdo a su etapa fenológica presenta dos estructuraciones diferentes, desde la etapa inicial a vegetativa se muestra muy corto de una forma casi acaule, estado en el que se lo aprovecha comercialmente (cosecha), en etapas de floración y fructificación se alarga hasta alcanzar longitudes de hasta 1.20 m, en variedades como Gallega.

Hojas

Por su forma puede ser lanceolada, oblonga, abovada, redonda. El borde de la hoja puede ser liso, lobulado, ondulado o dentado. Con superficie plana, rugosa o abarquillada. Por el color pueden ser amarillentas, verde claro, verde oscuro. Por su consistencia son tiernas o suaves y por su gusto levemente amargo o dulce.

2.6.6 Requerimientos edafoclimáticos

Temperatura

La temperatura media óptima para el desarrollo normal de la parte aérea aprovechable de la lechuga es de 15 – 18 ° C con máximas de 21 ° C y mínimas de 7 ° C. Si se presenta temperaturas bajas durante 10 a 30 días, hay emisión de tallos florales (Jaramillo, 1990).

Si las temperaturas son altas, aceleran el crecimiento del tallo floral y la calidad de la lechuga se deteriora rápidamente, debido a una acumulación del látex amargo en su sistema vascular (Cussianovich, 2001). Si baja la temperatura durante 10 a 30 días se promueve la emisión prematura de tallos florales. (Suquilanda, 2003).

Luminosidad

Se requiere de una luminosidad moderada, con fotoperiodos cortos, las hojas se vuelven blandas, pierden turgencia y en ocasiones el tallo se suelta, y con fotoperiodos mayores a 12 horas acompañados con temperaturas superiores a los 26 ° C promueven la formación del tallo floral. (Tirsconia, 1993).

Precipitación

El cultivo requiere entre los 1200 a 1500 milímetros anuales, necesitando entre 250 a 350 milímetros durante su periodo vegetativo. El exceso de humedad de campo es perjudicial para este tipo de cultivo pues favorece la proliferación de las enfermedades fungosas y bacterianas

Humedad relativa

El sistema radicular de la lechuga es muy reducido en comparación con la parte aérea, por lo que es muy sensible a la falta de humedad y soporta mal un periodo de sequía, aunque éste sea muy breve. Se considera que el nivel de humedad más adecuado para una buena producción de lechugas oscila entre el 60-70%. (Tirsconia, 1993).

Suelos y altitud

La lechuga se desarrolla bien entre los 1800 a 2800 m.s.n.m. La variedad Green Salad Bowl produce bien entre los 2200 a 2600 m.s.n.m. (Casseres, 1971).

En general todos los suelos son buenos para el cultivo de lechuga, si se trabaja en el clima apropiado, desarrolla bien en suelos con alto contenido de materia orgánica. Teniendo en cuenta que el sistema radicular de la lechuga no es muy extenso; los suelos que retienen bien la humedad y que a la vez presentan buen drenaje son los mejores; las mejores texturas son las franco arcillosas y franco arenosas. El pH más apropiado es de 5.2 a 5.8 en suelos orgánicos y de 5.5 a 6.7 en suelos minerales (Mallar, 1978).

2.6.7 Requerimientos nutricionales

Desde el punto de vista de la absorción de los nutrientes, el ciclo de la lechuga puede dividirse en dos fases fenológicas: la primera que comienza con la emergencia de la planta y se prolonga hasta la formación de las primeras hojas internas. La otra fase, se extiende desde la aparición de las primeras hojas internas hasta el final del ciclo. Esta última etapa abarca los últimos 30 días del ciclo de cultivo. Si bien no existen recomendaciones uniformes para el abonado de este cultivo, hay que tener en cuenta ciertas variables y una de la más importante es la extracción de nutrientes a lo largo del ciclo (Bertsch, 2003). Esta hortaliza es sensible al exceso de salinidad en el suelo (Angles, 1977). Los elementos esenciales para esta hortaliza son el nitrógeno y el potasio (Giacconi, 1990).

2.6.8 Método de siembra indirecta

El método de siembra indirecta es la operación mediante la cual una pequeña planta obtenida de almácigo es llevada al terreno definitivo, donde alcanzará su madurez comercial. Para lo cual se hace necesario la elaboración de almácigos o semilleros, los mismos que se pueden hacer a campo abierto en platabandas o bajo condiciones de invernadero (Montes, 1982). El mismo autor señala que, antes de ser llevadas al campo definitivo, las plantas deben recibir un tratamiento denominado "acostumbramiento" por un período de una semana a diez días.

2.6.9 Trasplante

El trasplante se lo realiza cuando las plántulas sembradas en semillero tienen un tamaño de 8 a 10 cm y presentan entre 4 a 5 hojas verdaderas, y consiste en trasladar las plántulas del semillero o pilón al lugar definitivo, para ello es recomendable no regar los semilleros por uno o dos días para que la raíz se adhiera al sustrato utilizado y evitar desgarres en el pan de tierra (Roldán, 2005). Las plantas así tratadas resisten mejor las condiciones desfavorables del trasplante, tales como un menor suministro de agua, vientos cálidos y secantes y bajas temperaturas. El trasplante debe hacerse fuera de las horas de calor primeras horas de la mañana o últimas de la tarde, prefiriendo los días nublados (Santos, *et al*, 2009).

2.6.10 Cosecha

La cosecha se realiza cuando la planta se ha formado en su totalidad. Se recomienda que la cosecha se realice en un día donde las temperaturas no sean tan elevadas, de preferencia por la tarde. La planta, para cosecharla, se corta en la base del cuello. El corte se debe realizar con mucho cuidado y de forma recta, de manera de no dañar la planta. Una vez cortadas, se comienza a eliminar las hojas secas o dañadas (Escaff, 2001).

2.6.11 Plagas.

Agromyzidae, especies de dípteros.
Agrotis ipsilon Hufnagel
Agrotis malefida Gueneé
Agrotis repleta Walker
Araecerus fasciculatus (De Geer)
Ascia monuste Linnaeus
Aulacorthum solani (Kaltenbach)
Bremisia tabaci (Gennadius)
Brevicoryne brassicae (L.)
Diabrotica balteata LeConte
D. decempunctata Latreille
D. speciosa Vigenes
D. viridicula F.
Frankliniella occidentalis (Pergande)

Helvicoverpa zea Boddie
Heliothis virescens Fabricius
Liriomyza huidobrensis (Blanchard)
Liriomyza sativae Blanchard
L. trifoli (Burgess)
Macrosiphum euphorbiae (Thomas)
Myzus persicae (Sulzer)

2.6.12 Enfermedades bacterianas.

Mancha foliar bacteriana y la podredumbre de la raíz
Xanthomonas campestris pv. *vitians*
 Pudrición blanda bacteriana
Erwinia carotovora (Jones)
Pseudomonas marginalis (Brown)
 Raíz de corcho
Rhizomonas spp.
R. suberifaciens
 Punto barnizado
Pseudomonas cichorii (Swingle)

2.6.13 Enfermedades fúngicas

Mancha foliar
Alternaria sonchi
Cercospora longissima
 Rizoctoniosis
Rhizoctonia solani
 Damping-off
Pythium spp.
P. ultimum
Rhizoctonia solani
 Mildiu lanoso
Bremia lactucae.
Plasmopara lactucae-radicis
 Pudrición húmeda
Sclerotinia sclerotiorum.
S. minor
 Podredumbre Gris
Botrytis cinerea
Botryotinia fuckeliana
 Mildiu polvoso
Erysiphe cichoracearum
 Roya
Puccinia dioicae
P. extensicola
 Septoria
Septoria lactucae

2.6.14 Enfermedades causadas por nematodos

Falso nudo de raíz
Nacobbus aberrans
 Lesiones

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Características del sitio experimental

3.1.1 Ubicación

La investigación se condujo en el laboratorio e invernadero de Microbiología y Fitopatología General, ubicados en el Campo Docente Experimental La Tola “CADET”, de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Central del Ecuador.

Provincia:	Pichincha
Cantón:	Quito
Parroquia:	Tumbaco
Altitud:	2460 m.s.n.m.
Latitud:	0° 13' 58''S.
Longitud:	78° 22' 05''O.

3.1.2 Condición Agroclimática

CADET: Según la Estación Agrometeorológica “La Tola”, las características del sitio en mención, son las siguientes:

Temperatura máxima:	25.5°C
Temperatura mínima:	7.7°C
Temperatura promedio:	16.2°C
Precipitación media/mensual:	75.5 mm.
Humedad relativa:	78.3%
Velocidad del viento:	3.0 m/s N y SE.
Luminosidad:	147.2 horas sol/ mes y 4.9 horas sol/día

Laboratorio: Las condiciones de humedad y temperatura en el Laboratorio fueron:

Temperatura máxima:	28°C
Temperatura mínima:	15°C
Temperatura promedio:	18°C
Humedad relativa:	60%

Invernadero: De acuerdo a los registros realizados en el invernadero de Microbiología y Fitopatología General, con la ayuda de un termómetro y un higrómetro, se registraron las siguientes condiciones meteorológicas:

Temperatura máxima aproximada:	26.5°C
Temperatura mínima aproximada:	7.7°C
Temperatura promedio aproximada:	16.2°C
Humedad relativa aproximada:	78.3%

3.2 Materiales de laboratorio

3.2.1 Material Biológico

Aislamiento de *Azotobacter spp* proveniente del CADET, sector de cultivo de hortalizas. (Vélez 2010).

3.2.2 Material vegetal

Semilla de lechuga (*Lactuca sativa*). Variedad Green salad bowl.

3.2.3 Material físico

Materiales: cajas de petri, pipetas, micropipetas, vasos de precipitación, probetas, tubos de ensayo, varillas de agitación, mechero de bunsen, asa de platino, cintas parafilm, fundas de plástico, rótulos.

Equipo: cámara de flujo laminar, incubadora, microscopio óptico, refrigerador, autoclave, horno de microondas, destilador de agua, agitador magnético, balanza de precisión y potenciómetro.

3.2.4 Reactivos

Aislamiento:

Medio Ashby específico para *Azotobacter spp*. Anexo1.

Pruebas bioquímicas:

Tinción Gram; Prueba de la catalasa; Prueba de la oxidasa; Prueba de ureasa; Prueba del indol; Prueba de amilasa; Prueba del citrato.

3.2.5 Soportes bacterianos

Cada formulación se preparó cumpliendo los estándares fijados por Basham (2009) y Somasegaran, *et al*, (1994), utilizando materiales baratos y de fácil adquisición (Cuadro 1). Los soportes elegidos correspondieron a las recomendaciones de los siguientes investigadores:

(Rivera, M. *et al*, 2011; Santillana, 2006; Cepeda, 2008; Cordova, *et al*, 2009; Cordova, *et al*, 2010; Dibut *et al*, 2005; Egas, 2010)

Cuadro 1.- Formulaciones de soportes para la evaluación de adaptación y sobrevivencia de *Azotobacter spp.* Tumbaco-Pichincha 2013.

Núm.	Código	Formulación
1	AH	Residuo industria cervecera denominado "Afrecho húmedo" puro sin tratar
2	AS	Residuo industria cervecera denominado "Afrecho seco" puro sin tratar
3	LC	Residuo industria cervecera denominado "Levadura seca" en dilución con agua destilada esterilizada en relación 2:12
4	Ase	Residuo industria cervecera denominado "Afrecho seco" con levadura seca diluida en relación 3:6
5	JC	Jugo extraído de la trituration de la caña puro sin tratar
6	JCD1	Jugo de caña en dilución 1:10 con agua destilada esterilizada
7	JCD2	Jugo de caña en dilución 1:5 con agua destilada esterilizada
8	JCD3	Jugo de caña en dilución 1:3.33 con agua destilada esterilizada
9	JCe	Jugo de caña enriquecido con levadura seca diluida en relación 6:3
10	JCM	Jugo de caña en solución mineral con NaCl 0.17 g ^l ⁻¹ ; NH ₄ (SO ₄) 0.10 g ^l ⁻¹ ; Mg(SO ₄) 0.0082 g ^l ⁻¹ ; Extracto levadura 3.5 g ^l ⁻¹ ; Agua peptona 5.0 g ^l ⁻¹ ; CaCO ₃ 0.05 g ^l ⁻¹ .
11	JCMD1	Jugo de caña en solución mineral en dilución 1:10 con agua destilada esterilizada
12	JCMD2	Jugo de caña en solución mineral en dilución 1:5 con agua destilada esterilizada
13	JCMD3	Jugo de caña en solución mineral en dilución 1:33 con agua destilada esterilizada
14	JCMe	Jugo de caña en solución mineral con levadura seca diluida en relación 6:3
15	A	Mineralizado A con peptona 10.0 g ^l ⁻¹ ; NaCl 5.0 g ^l ⁻¹ ; Extracto de carne 3.0g ^l ⁻¹ y K ₃ PO ₄ 0.3 g ^l ⁻¹
16	Ae	Mineralizado A con levadura seca en dilución 1:5 con agua destilada esterilizada
17	B	Mineralizado B con peptona 5.0 g ^l ⁻¹ ; NaCl 5.0 g ^l ⁻¹ ; Extracto de carne 1.5 g ^l ⁻¹
18	Be	Mineralizado B con levadura seca en dilución 1:5 con agua destilada esterilizada
19	C	Mineralizado C con peptona 2.5 g ^l ⁻¹ ; NaCl 5.0 g ^l ⁻¹ ; Extracto de levadura 1.0 g ^l ⁻¹
20	Ce	mineralizado C con levadura seca en dilución 1:5 con agua destilada esterilizada
21	D	Mineralizado D con NaCl 5.0 g ^l ⁻¹ ; Extracto de levadura 1.0 g ^l ⁻¹ ; sacarosa 5.0 g ^l ⁻¹ ; K ₃ PO ₄ 0.3 g ^l ⁻¹
22	De	Mineralizado D con levadura seca en dilución 1:5 con agua destilada esterilizada
23	PKM	Mineralizado PKM
24	S1	Suero en dilución 1:1 con agua destilada esterilizada

Continuación Cuadro 1

Núm.	Código	Formulación
25	S2	Suero en dilución 1:2 con agua destilada esterilizada
26	S3	Suero en dilución 1:3 con agua destilada esterilizada
27	S4	Suero en dilución 1:4 con agua destilada esterilizada
28	Se1	Suero, levadura diluida, y Jugo de caña, relación 2:1:2
29	Se2	Suero y jugo de caña modificado, relación 1:1
30	Se3	Suero, levadura diluida, y Jugo de caña, relación, 4:1:2
31	Se4	Suero, jugo de caña modificado, relación 2:1
32	Se5	Suero y jugo de caña, relación 1:1
33	Se6	Suero, levadura y jugo de caña modificado, relación 2:1:2
34	Se7	Suero y jugo de caña, relación 2:1
35	Se8	Suero, levadura y jugo de caña modificado, relación 4:1:2
36	Ti	Tierra esterilizada
37	T	Turba esterilizada

Fuente y Elaborado: David Castro.
Año: 2013.

3.3 Material de invernadero

3.3.1 Materiales:

Flexómetro, macetas, rótulos, suelo esterilizado, fundas plásticas, aislamientos bacterianos, agua destilada esterilizada, pipetas y nebulizadores.

3.3.2 Equipos:

Bomba de mochila, sistema de riego.

3.4 Experimento de laboratorio

3.4.1 Factores en estudio

Soportes (S)

Los soportes se seleccionaron de un total de 37 formulaciones en ensayo preliminar de densidad bacteriana.

Factores en estudio	Codificación	Descripción	Abreviatura
Soporte 1	s1	Residuo industria cervecera denominado “Afrecho húmedo” puro sin tratar	AH
Soporte 2	s2	Jugo de Caña Modificado Enriquecido	JCMe
Soporte 3	s3	Suero, jugo de caña modificado relación 2:1	Se4
Soporte 4	s4	Suero, levadura y jugo de caña modificado relación 4:1:2	Se8
Soporte 5	s5	Tierra esterilizada	Ti
Soporte 6	s6	Turba esterilizada	T

Temperatura (T)

Factor en estudio	Descripción	Codificación
Refrigeración	5 grados Celcius	t1
Incubación	30 grados Celcius	t2
Ambiente	20 grados Celcius	t3

3.4.2 Tratamientos

Los tratamientos resultaron de la combinación de los seis soportes preseleccionados y tres diferentes grados de temperatura, como se aprecia en el Cuadro 2.

Cuadro 2.- Interacción entre soportes promisorios y temperaturas, conformados para evaluar la capacidad de brindar albergue a *Azotobacter spp*, durante 90 días. Tumbaco, Pichincha.

Trat.	Codificación	Descripción
t1	s1t1	Residuo industria cervecera denominado “Afrecho húmedo” puro sin tratar a 5° C.
t2	s1t2	Residuo industria cervecera denominado “Afrecho húmedo” puro sin tratar a 30° C.
t3	s1t3	Residuo industria cervecera denominado “Afrecho húmedo” puro sin tratar a 20° C.
t4	s2t1	Jugo de caña en solución mineral con NaCl 0.17 g ^l ⁻¹ ; NH ₄ (SO ₄) 0.10 g ^l ⁻¹ ; Mg(SO ₄) 0.0082 g ^l ⁻¹ ; Extracto levadura 3.5 g ^l ⁻¹ ; Agua peptona 5.0 g ^l ⁻¹ ; CaCO ₃ 0.05 g ^l ⁻¹ a 5° C.
t5	s2t2	Jugo de caña en solución mineral con NaCl 0.17 g ^l ⁻¹ ; NH ₄ (SO ₄) 0.10 g ^l ⁻¹ ; Mg(SO ₄) 0.0082 g ^l ⁻¹ ; Extracto levadura 3.5 g ^l ⁻¹ ; Agua peptona 5.0 g ^l ⁻¹ ; CaCO ₃ 0.05 g ^l ⁻¹ a 30° C.
t6	s2t3	Jugo de caña en solución mineral con NaCl 0.17 g ^l ⁻¹ ; NH ₄ (SO ₄) 0.10 g ^l ⁻¹ ; Mg(SO ₄) 0.0082 g ^l ⁻¹ ; Extracto levadura 3.5 g ^l ⁻¹ ; Agua peptona 5.0 g ^l ⁻¹ ; CaCO ₃ 0.05 g ^l ⁻¹ a 20° C.
t7	s3t1	Suero, jugo de caña modificado relación 2:1 a 5° C.
t8	s3t2	Suero, jugo de caña modificado relación 2:1 a 30° C.
t9	s3t3	Suero, jugo de caña modificado relación 2:1 a 20° C.
t10	s4t1	Suero, levadura y jugo de caña modificado relación 4:1:2a 5° C.
t11	s4t2	Suero, levadura y jugo de caña modificado relación 4:1:2a 30° C.
t12	s4t3	Suero, levadura y jugo de caña modificado relación 4:1:2a 20° C.
t13	s5t1	Tierra esterilizada a 5° C.
t14	s5t2	Tierra esterilizada a 30° C.
t15	s5t3	Tierra esterilizada a 20° C.
t16	s6t1	Turba esterilizada a 5° C.
t17	s6t2	Turba esterilizada a 30° C.
t18	s6t3	Turba esterilizada a 20° C.

Elaborado por: David Castro
Año: 2013.

3.4.3 Unidad Experimental

La unidad experimental consistió en un frasco de vidrio de 200 cm³ de capacidad.

3.4.4 Análisis estadístico utilizado para seleccionar soportes en laboratorio

Diseño experimental

Se utilizó un diseño Completamente al Azar de 6x3, cinco observaciones.

Para tener un mejor detalle del suceso se registro durante tres épocas diferentes durante los 90 días de evaluación (15, 45 y 90 días).

Número de tratamientos

Se empleó un total de dieciocho tratamientos que se distribuyeron totalmente al azar dentro del sitio experimental.

Número de observaciones

Cinco por tratamiento.

3.4.5 Características del experimento

Área neta del ensayo	4x3 m
Área total del ensayo	12 m ²
Número de frascos de vidrio de 200 cm ³	105
Número total de unidades experimentales	105
Área de la unidad experimental neta	un frasco de vidrio de 200 ml
Área total de la unidad experimental	un frasco de vidrio de 200 ml

3.4.6 Análisis de la variancia (ADEVA)

Para la fase laboratorio se realizó el siguiente ADEVA:

Cuadro 3.- Análisis de la variancia para la evaluación de soportes en el mantenimiento de *Azotobacter spp*, en diferentes condiciones ambientales. Tumbaco-Pichincha, 2013.

Fuentes de variación	Grados de libertad
TOTAL	269
TRATAMIENTOS	17
SOPORTES (S)	5
TEMPERATURA (T)	2
S x T	10
ERROR EXP.	252
Promedio:	
COEFICIENTE DE VARIACIÓN: %	

3.4.7 Análisis funcional

Cuando en el ANOVA se detectó diferencias significativas o altamente significativas en las interacciones, se analizaron los datos con una prueba de medias de Tukey a un rango de confiabilidad del 95 %.

3.5 Fase de invernadero

3.5.1 Factores en estudio

Soportes (S)

Se conforma por los soportes seleccionados en ensayo de laboratorio para evaluarlos en el invernadero.

Factores en estudio	Codificación	Descripción	Abreviatura
Soporte 1	s1	Jugo de caña en solución mineral con NaCl 0.17 g ^l ⁻¹ ; NH ₄ (SO ₄) 0.10 g ^l ⁻¹ ; Mg(SO ₄) 0.0082 g ^l ⁻¹ ; Extracto levadura 3.5 g ^l ⁻¹ ; Agua peptona 5.0 g ^l ⁻¹ ; CaCO ₃ 0.05 g ^l ⁻¹ inoculado y mantenido por 90 días a 5 °C	JCMe+5°C
Soporte 2	s2	Tierra inoculada y mantenida por 90 días a 5°C	Ti+5°C
Soporte 3	s3	Turba inoculada y mantenida por 90 días a 20°C	T+20°C

Inoculación (I)

Factores en estudio	Descripción	Codificación
Una inoculación	Inoculación a la siembra	i0
Dos inoculaciones	En la siembra y 3 días después del transplante	i1
Tres inoculaciones	En la siembra, 3 y 15 días después del transplante	i2

Adicionales (A)

Testigo absoluto (sin cepa)	a0
Agua inoculada con <i>Azotobacter spp.</i>	a1
Liofilizado de <i>Azotobacter spp</i>	a2
Cepa de <i>Azotobacter spp</i> aislada y purificada	a3

3.5.2 Tratamientos

Los tratamientos en estudio se conformaron en base a los tres soportes que ofrecieron en el laboratorio los mayores períodos de sobrevivencia, los cuales fueron inoculados en tres diferentes modalidades y épocas, conforme se detalla en el cuadro 4.

Cuadro 4.- Análisis de la varianza para la evaluación de épocas de inoculación y tipos de inoculantes de *Azotobacter spp*, en el cultivo de plantas de *lactuca sativa*. Tumbaco-Pichincha, 2013.

Trat.	Codificación	Descripción
t1	s1i0	Jugo de caña en solución mineral con NaCl 0.17 gl ⁻¹ ; NH ₄ (SO ₄) 0.10 gl ⁻¹ ; Mg(SO ₄) 0.0082 gl ⁻¹ ; Extracto levadura 3.5 gl ⁻¹ ; Agua peptona 5.0 gl ⁻¹ ; CaCO ₃ 0.05 gl ⁻¹ inoculado en la siembra
t2	s1i1	Jugo de caña en solución mineral con NaCl 0.17 gl ⁻¹ ; NH ₄ (SO ₄) 0.10 gl ⁻¹ ; Mg(SO ₄) 0.0082 gl ⁻¹ ; Extracto levadura 3.5 gl ⁻¹ ; Agua peptona 5.0 gl ⁻¹ ; CaCO ₃ 0.05 gl ⁻¹ inoculado en la siembra y 3 días después del trasplante
t3	s1i2	Jugo de caña en solución mineral con NaCl 0.17 gl ⁻¹ ; NH ₄ (SO ₄) 0.10 gl ⁻¹ ; Mg(SO ₄) 0.0082 gl ⁻¹ ; Extracto levadura 3.5 gl ⁻¹ ; Agua peptona 5.0 gl ⁻¹ ; CaCO ₃ 0.05 gl ⁻¹ inoculado en la siembra, 3 y 15 días después del trasplante
t4	s2i0	Tierra inoculada y mantenida por 90 días a 5°C inoculado en la siembra
t5	s2i1	Tierra inoculada y mantenida por 90 días a 5°C inoculado en la siembra y 3 días después del trasplante
t6	s2i2	Tierra inoculada y mantenida por 90 días a 5°C inoculado en la siembra, 3 y 15 días después del trasplante
t7	s3i0	Turba inoculada y mantenida por 90 días a 20°C inoculado en la siembra
t8	s3i1	Turba inoculada y mantenida por 90 días a 20°C inoculado en la siembra y 3 días después del trasplante
t9	s3i2	Turba inoculada y mantenida por 90 días a 20°C inoculado en la siembra, 3 y 15 días después del trasplante
t10	a0	Testigo absoluto (sin cepa)
t11	a1	Agua inoculada con <i>Azotobacter spp</i> .
t12	a2	Liofilizado de <i>Azotobacter spp</i>
t13	a3	Cepa de <i>Azotobacter spp</i> aislada y purificada

Elaborado por: David Castro

Año: 2013.

3.5.3 Unidad Experimental

Una maceta de 500 cm³ de capacidad.

3.5.4 Análisis estadístico en el invernadero para seleccionar soportes

Diseño experimental

Diseño Completamente al Azar con un arreglo factorial de 3 x 3 + 4 con 10 observaciones.

Número de tratamientos

Son doce tratamientos.

Número de observaciones

Diez por tratamiento.

3.5.5 Características del experimento

Se implementó un experimento para evaluar la influencia de la bacteria en el desarrollo del cultivo de lechuga inoculado en diversas épocas con los soportes que permitieron al inóculo una mayor sobrevivencia.

Área total del ensayo	6x8 m
Área neta del ensayo	48 m ²
Número de macetas	130
Número total de unidades experimentales	130
Número total de plantas	130
Número de plantas por tratamiento	una
Área de la unidad experimental neta	1 maceta
Área total de la unidad experimental	1 maceta

3.5.6 Análisis de la variancia (ADEVA)

Para la fase de invernadero se utilizó el siguiente ADEVA (Cuadro 5).

Cuadro 5.- ADEVA para analizar bajo condiciones de invernadero, la influencia en el cultivo de *Lactuca sativa*, de épocas de inoculación y tipos de inoculantes de *Azotobacter spp.* Tumbaco-Pichincha. 2013.

Fuentes de variación	Grados de libertad
TOTAL	129
TRATAMIENTOS	12
SOPORTES (S)	2
INOCULACIÓN (I)	2
S x I	4
ADICIONAL	3
FACTORIAL VS	1
ADICIONAL	
ERROR	117
Promedio:	
COEFICIENTE DE VARIACIÓN: %	

3.5.7 Análisis funcional

Cuando en el ADEVA se detectaron diferencias significativas o altamente significativas tanto en los factores en estudio como en las interacciones, se analizó los datos con una prueba de medias de Tukey con un rango de confiabilidad del 95 %. Además se calculó la Prueba de Diferencia Mínima Significativa al 5% para el Factorial vs. Adicionales.

3.6 Variables y métodos de evaluación

3.6.1 Albergue de la bacteria en los soportes

Se realizaron observaciones periódicas aislando fracciones de los soportes en el medio “Ashby” y se registró el desarrollo de las colonias. Se seleccionaron aquellos soportes que mantuvieron viables los mayores números de células bacterianas. Anexo 9

3.6.2 Número más probable de bacterias (Woomer 1994)

Para cada tratamiento, las colonias desarrolladas sobre el medio de cultivo se suspendieron en un volumen determinado de agua destilada esterilizada, mediante diluciones seriadas hasta llegar a (1×10^{-6}) y, luego, se incubaron a 30° C por 48 horas. Posteriormente, con un conteo de crecimientos positivos y negativos, se calculó el número más probable, basándose en la tabla probabilística de “Woomer 1994”. Anexo 12

3.6.3 Pesó de Hojas funcionales

En el momento de la cosecha, se separaron las hojas de la lechuga correspondiente y se registró el peso de hojas funcionales. Esta variable se expresó en gramos.

3.7 Métodos de manejo del experimento

3.7.1 Aislamiento primario.

Con la muestra de suelo recolectada CADET se realizó el aislamiento primario, para lo cual, se empleó la técnica de siembra de gránulos de suelo, colocando a 20 de ellos sobre la superficie del medio de cultivo “Ashby”, específico para el desarrollo de *Azotobacter spp.* Los aislamientos se incubaron a 30°C durante tres días, hasta que se observaron colonias bacterianas típicas del género. Se consideraron como colonias primarias a aquellas que se mostraron translúcidas y mucilaginosas, (Aquilanti *et al*, 2004). Anexo 4

3.7.2 Aislamiento secundario.

Las colonias obtenidas en el aislamiento primario se sembraron en el medio “Ashby”. Para el efecto, se rayó el medio con una suspensión de esporas obtenidas en el aislamiento primario. Los aislamientos se incubaron a 30°C durante tres días, hasta que se obtuvieron las colonias translúcidas y mucilaginosas típicas de *Azotobacter spp.*, tal como las describe (Aquilanti *et al*, 2004). Anexo 4

Para mantener un inoculante adecuado se purificó el aislamiento inicial.

3.7.3 Identificación de la bacteria

La bacteria se identificó en base a sus características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. Para identificar el género se utilizó el medio “Ashby” y para la especie el medio “Agar almidón”, además de una serie de pruebas bioquímicas. Anexo 5

3.7.4 Inoculación de los soportes

Se vertió en frascos de vidrio de 200 cm³ de capacidad esterilizados, 20 g de cada soporte con un pH neutro. Inmediatamente se esterilizó el sustrato y se lo inoculó con *Azotobacter spp* purificado en una concentración de 1.21×10^{11} de UFC x ml⁻¹

3.7.5 Preselección de soportes en el laboratorio.

La preselección de soportes se realizó luego de registrar la sobrevivencia de la bacteria en cada uno de ellos. Para esto, se realizaron observaciones periódicas cualitativas y cuantitativas de la presencia de colonias en cada soporte. Las observaciones cualitativas se fundamentaron en la presencia de las colonias típicas de la bacteria en el medio Ashby; y, las cuantitativas contabilizando el número más probable (Woomer, 1994). Anexo 6

3.7.6 Selección de soportes

La observación del comportamiento de los soportes preseleccionados se realizó hasta los 90 días, para lo cual, se los sometió a diversas temperaturas y se los observó periódicamente, tanto para registrar la presencia de colonias como para contabilizar el número más probable de bacterias.

3.7.7 Inoculación de las bacterias provenientes de los soportes seleccionados

Las bacterias de los soportes seleccionados se sembraron en el medio Ashby, desde donde se las obtuvo para inocularlas en lechuga siguiendo las tres siguientes modalidades: la primera antes de la siembra adhiriendo la bacteria a la semilla impregnada con agua azucarada en una dilución de 4:1; la segunda incorporando la bacteria en el suelo 3 días después del trasplante; y, la última, también incorporando la bacteria en el suelo, 15 días después del trasplante.

3.7.8 Evaluación del efecto promotor de las bacterias seleccionadas

La acción promotora para el crecimiento de las plantas por parte de las bacterias, se registró en base al peso de hojas funcionales.

3.7.9 Labores culturales

Transplante.-Se llevó a cabo cuando las plántulas presentaron de tres a cuatro hojas y una altura aproximada de cinco centímetros.

Deshierba.- Se realizó manualmente, según los requerimientos de la planta.

Riego.- En cada planta se aplicó riego por goteo fijando una lámina promedio de 2 mm.

Cosecha.-Transcurrido el ciclo vegetativo del cultivo, se procedió a la cosecha de forma manual.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Identificación de la bacteria

Siguiendo las recomendaciones y con similitud en los resultados de Garassini, (1967), Vélez, (2010) y Vázquez, (2011) se obtuvo que:

Las colonias en los aislamientos fueron pequeñas, convexas, de color crema, irregulares y brillantes, similares a las reportadas para el género *Azotobacter spp.* Anexo 3

De la microscopia realizada se observó células de ovoides a bacilares, individuales, apareadas o agrupadas en cadenas. De un amplio tamaño en comparación con otras bacterias. Anexo 3

Bioquímicamente la cepa es; gram negativa, catalasa positiva, oxidasa positiva, indol positiva, citrato positiva, ureasa positiva, formación de quistes positiva. Anexo 5

Se observó en los aislamientos que después de tres o cuatro días presentaban una pigmentación marrón oscuro, característica propia de las especies *A. chroococcum*, *A. nitricans* y *A. armenicus*.

La pigmentación de las colonias no es una característica definitiva para identificar la especie, por cuyo motivo es necesario en este caso, tal como lo recomienda Vélez, (2010), realizar una prueba de ADN.

Sin embargo, de acuerdo a las pruebas bioquímicas realizadas y en concordancia con Jiménez, (2007), la cepa en estudio es *Azotobacter chroococcum*.

4.2 Preselección de los soportes

Con los 37 soportes formulados e inoculados para realizar las pruebas de mantenimiento de la bacteria, se preseleccionaron seis (Cuadro 6), en base a la capacidad de albergue ofrecido a 5°C durante 30 días.

El mayor albergue lo ofreció el soporte “Se4” con una población de 1.56×10^{10} UFC x ml⁻¹, en tanto que, el menor correspondió al soporte “JC” con 3.80×10^4 UFC x ml⁻¹. De esta manera se concluye que, la sobrevivencia bacteriana dependió de la composición de cada sustrato. (Cuadros 1 y 6).

Estas diferencias se denotaron cuando, se comparó la población inicial uniforme inoculada para cada sustrato (1.21×10^{11} UFC x ml⁻¹), con las finales registradas a los 30 días. En este caso, únicamente las dos primeras formulaciones favorecieron la multiplicación microbiana con 1.30 veces (soportes, “Se4” y “Ti”), por otro lado, con las 35 siguientes formulaciones hubo un decrecimiento que varió desde 8.16×10^{-1} veces (soporte “JCMe”) hasta 1.28×10^{-5} veces (soporte “Se2”). (Cuadro 6).

Las formulaciones que al final de los 30 días ofrecieron mayor albergue fueron las siguientes: “Se4”, “Ti”, “JCMe”, “Se8”, “AH”, “T”. Con estos sustratos se lograron poblaciones que fluctuaron desde 1.56×10^{10} UFC x ml⁻¹, hasta 6.56×10^9 UFC x ml⁻¹, las mismas que superaron a la población aproximada de 100×10^6 UFC x ml⁻¹, reportada por varios investigadores como ideal para el uso de un biofertilizante: Corvalán *et al*, (2006), Cepeda (2008), Bordeleau *et al*, (1981), Fujii *et al*, (1987). Al respecto, Vélez (2010), que trabajó con la bacteria utilizada en la presente investigación, manifiesta que poblaciones entre 10×10^6 UFC x ml⁻¹ y 30×10^6 UFCx ml⁻¹, ofrecen una buena colonización y efecto promotor para el crecimiento de plantas de lechuga (Cuadro 6).

Cuadro 6.- Poblaciones bacterianas registradas en los soportes utilizados para su albergue luego de 30 días a 5°C. Tumbaco-Pichincha, 2013.

Codificación	Número más probable calculado UFC x ml ⁻¹	Relación del crecimiento UFC x ml ⁻¹
Se4	1.56x10 ¹⁰	1.30x10 ⁰
Ti	1.56x10 ¹⁰	1.30x10 ⁰
JCMe	9.84x10 ⁹	8.16x10 ⁻¹
Se8	6.56x10 ⁹	5.44x10 ⁻¹
AH	6.56x10 ⁹	5.44x10 ⁻¹
T	6.56x10 ⁹	5.44x10 ⁻¹
S3	2.77x10 ⁹	2.29x10 ⁻¹
Se3	2.77x10 ⁹	2.29x10 ⁻¹
B	2.14x10 ⁹	1.77x10 ⁻¹
C	2.14x10 ⁹	1.77x10 ⁻¹
PKM	1.56x10 ⁹	1.30x10 ⁻¹
S2	2.55x10 ⁸	2.11x10 ⁻²
JCMD1	1.38x10 ⁸	1.15x10 ⁻²
JCMD2	1.38x10 ⁸	1.15x10 ⁻²
JCMD3	9.84x10 ⁷	8.16x10 ⁻²
A	9.84x10 ⁷	8.16x10 ⁻²
S1	6.56x10 ⁷	5.44x10 ⁻³
D	2.14x10 ⁷	1.77x10 ⁻³
S4	4.60x10 ⁶	3.81x10 ⁻⁴
Se1	1.56x10 ⁶	1.29x10 ⁻⁴
De	1.38x10 ⁶	1.14x10 ⁻⁴
JCe	6.60x10 ⁵	5.47x10 ⁻⁵
Se5	5.40x10 ⁵	4.48x10 ⁻⁵
LC	4.60x10 ⁵	3.81x10 ⁻⁵
Ase	4.60x10 ⁵	3.81x10 ⁻⁵
Ce	4.60x10 ⁵	3.81x10 ⁻⁵
JCD3	3.20x10 ⁵	2.65x10 ⁻⁵
Be	3.20x10 ⁵	2.65x10 ⁻⁵
Se6	2.60x10 ⁵	2.15x10 ⁻⁵
AS	2.40x10 ⁵	1.99x10 ⁻⁵
JCD1	1.54x10 ⁵	1.28x10 ⁻⁵
JCM	1.54x10 ⁵	1.28x10 ⁻⁵
Ae	1.54x10 ⁵	1.28x10 ⁻⁵

Continuación Cuadro 6.

Codificación	Número más probable calculado UFC x ml ⁻¹	Relación del crecimiento UFC x ml ⁻¹
Se2	1.54x10 ⁵	1.28x10 ⁻⁵
JCD2	1.36x10 ⁵	1.13x10 ⁻⁵
Se7	1.36x10 ⁵	1.13x10 ⁻⁵
JC	3.80x10 ⁴	3.15x10 ⁻⁶

Elaborado por: David Castro

Año: 2013.

4.3 Selección de los soportes

Los soportes durante los 90 días de evaluación ofrecieron diversos grados de albergue a la bacteria, de acuerdo a su formulación (Cuadro 6) y a la temperatura de mantenimiento. (Cuadro 2).

4.3.1 Influencia de los sustratos mantenidos a 5°C durante 15 días.

De acuerdo al análisis de la variancia de los datos de sobrevivencia bacteriana, los soportes albergaron a la bacteria en diferentes proporciones, mostrando una diferencia altamente significativa (Cuadro 7).

En cuanto que de la comparación entre los soportes sólidos; afrecho húmedo “AH” (s1), tierra “Ti” (s5) y turba “T” (s6), frente a los líquidos; Jugo de caña modificado “JCMe” (s2), suero modificado 4 “Se4” (s3) y suero modificado 8 “Se8” (s4), no se presentó diferencia estadística, es decir la bacteria no mostró preferencias por la consistencia del soporte, al menos en el tiempo de evaluación. (Cuadro 7)

Con las comparaciones, que se muestra en el mismo Cuadro 7, entre el soporte afrecho húmedo “AH” (s1), frente a los soportes tierra “Ti”(s5) y turba “T” (s6), según los promedios que se muestran, en el Cuadro 7, se impone el afrecho húmedo “AH” (s1) con una diferencia altamente significativa. Así también, el soporte tierra “Ti” (s5) se destaca del soporte turba “T” (s6), con una diferencia de alta significación estadística.

Cuadro 7.- ADEVA de registros de sobrevivencia de *Azotobacter spp* en seis diferentes soportes mantenidos a 5 °C durante 15 días, Tumbaco-Pichincha. 2013.

F de V	GL	SC	CM	Fcal
TOTAL	29			
SOPORTES	5	108.48	21.70	9.7**
s1 vs s5s6	1	19.10	19.10	8.57**
s2 vs s3s4	1	33.34	33.34	14.96**
s3 vs s4	1	1.04	1.04	0.47ns
s5 vs s6	1	52.06	52.06	23.35**
s1s5s6 vs s2s3s4	1	2.93	2.93	1.31ns
ERROR EXP.	24	53.50	2.23	
Promedio (ln)			22.64	
Promedio real (exp e) (UFC x ml ⁻¹)			6.82 x 10 ⁹	
CV (%)			6.59	
Elaborado por: David Castro				
Año: 2013.				

El soporte que albergó en mayor proporción a *Azotobacter spp*, fue afrecho húmedo “AH” (s1), seguido del sustrato jugo de caña modificado “JCMe” (s2); por otro lado, la turba “T” (s6) mantuvo en menor proporción a la bacteria.

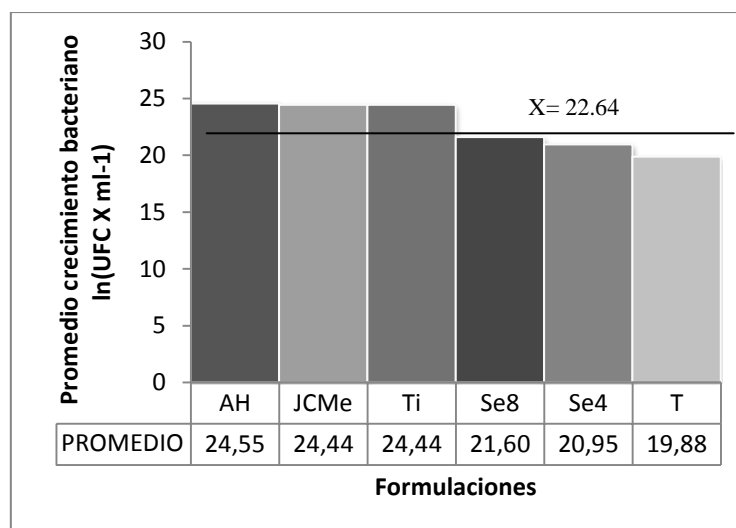
A la vez, los soportes que ofrecieron las condiciones para que la población bacteriana se incrementara de 1.06 veces afrecho húmedo “AH” (s1), hasta 1.05 veces tierra “Ti” (s5), mientras en los tres últimos soportes se registró una disminución de la población hasta de 0.86 veces durante los primeros 15 días de evaluación. (Cuadro 8, Gráfico 1).

Según la prueba de Tukey al 5%, Cuadro 8, se conformaron cuatro rangos de significación, de donde en el primer rango se agruparon los soportes, afrecho húmedo “AH” (s1), Jugo de caña modificado “JCMe” (s2) y tierra “Ti” (s5), mientras el soporte turba “T” (s6) se ubicó en el cuarto rango con la menor capacidad de hospedaje para la bacteria.

Cuadro 8.- Prueba de significación Tukey al 5% para la sobrevivencia de *Azotobacter spp*, mantenida a 5 °C durante 15 días, en seis diferentes soportes. Tumbaco-Pichincha. 2013.

Soportes	Codificación	Promedio Ln (UFC x ml ⁻¹)	Relación con la población inoculada	Significación
s1	AH	24.55	1.06	a
s2	JCMe	24.44	1.05	a
s5	Ti	24.44	1.05	a
s4	Se8	21.60	0.93	b
s3	Se4	20.95	0.90	c
s6	T	19.88	0.86	d

Elaborado por: David Castro
Año: 2013.



Elaborado por: David Castro
Año: 2013.

Gráfico 1.- Sobrevivencia de *Azotobacter spp*, mantenida en diversos soportes durante 15 días a 5 °C. Tumbaco, Pichincha. 2013.

4.3.2 Influencia de los sustratos mantenidos a 5°C durante 45 días.

Según el análisis estadístico realizado a los datos de sobrevivencia de la bacteria mantenida durante 45 días en los diferentes soportes se diferenciaron al nivel del 5%, Cuadro 9, significativamente.

En tanto que, con las comparaciones realizadas entre los soportes sólidos; afrecho húmedo “AH” (s1), tierra “Ti” (s5) y turba “T” (s6), frente a los líquidos; Jugo de caña modificado “JCMe” (s2), suero modificado 4 “Se4” (s3) y suero modificado 8 “Se8” (s4), indican que los soportes sólidos dan mejor albergue que los soportes líquidos a *Azotobacter spp*, con una diferencia altamente significativa. Esta preferencia diferencial en la consistencia del soporte nos indica lo mencionado por (Somasegaran *et al* 1994), que declara a los soportes sólidos como más estables para *Azotobacter* a manera general debido a que su evolución y adaptación se ha desarrollado en el

suelo. También el suelo es uno de los primeros soportes en ser utilizados para la comercialización de *Rhizobium spp.* (Bordelau, et al 1981).

Del mismo análisis se identifica que entre soportes sólidos no existe diferencia estadística; pero sí para los soportes líquidos en donde se destaca el jugo de caña modificado “JCMe” (s2) de los otros dos. En efecto el soporte jugo de caña modificado “JCMe” contiene una solución mineral, Cuadro 6, en su composición que lo hace quizás se destaque de los otros soportes adicionales.

Cuadro 9.- Análisis estadístico de registros de sobrevivencia de *Azotobacter spp.* mantenida a 5 °C durante 45 días, en seis diferentes soportes. Tumbaco-Pichincha. 2013.

F de V	GL	SC	CM	Fcal
TOTAL	29			
SOPORTES	5	76.33	15.27	2.73*
s1vss5s6	1	2.00	2.00	0.90ns
s2vss3s4	1	18.96	18.96	8.51**
s3vss4	1	16.23	16.23	7.28*
s5vss6	1	0.07	0.07	0.03ns
s1s5s6 vs s2s3s4	1	39.07	39.07	17.53**
ERROR EXP.	24	134.05	5.59	
Promedio (ln)				22.34
Promedio real (exp e) (UFC x ml ⁻¹)				5.09 x 10 ⁹
CV (%)				10.57
Elaborado por:	David Castro			
Año:	2013.			

Al igual de lo que sucedió a los 15 días, el soporte que albergó en mayor cantidad a la bacteria en estudio fue el afrecho húmedo “AH” (s1), no obstante, el que le siguió fue el soporte tierra “Ti” (s5) reemplazando la ubicación mantenida hasta los 15 días (Cuadro 8) por el soporte jugo de caña modificado “JCMe” (s2), Cuadro 10. Por otro lado, el sustrato turba “T” (s6) se ubica con su promedio en el tercer lugar, del mismo Cuadro 10, mejorando la posición mantenida hasta los 15 días, Cuadro 8.

Se destaca también que, la población inoculada en un inicio (2×10^8 UFC \times ml⁻¹), después de 45 días aparecen con un incremento apenas de 1.03 veces afrecho húmedo “AH” (s1) hasta 1.00 veces turba “T” (s6), y un decremento de 0.82 veces con el soporte suero modificado 4 “Se4” (S3), (Cuadro 10, Gráfico 2).

En efecto la población a los 45 días a 5 °C, Cuadro 10, es mayor a la población bacteriana registrada con los mismos seis soportes a los 30 días, Cuadro 6, del ensayo preliminar realizado en el presente estudio.

Estas bacterias son aerobias, pero pueden crecer en concentraciones de oxígeno bajas. Además son organismos quimioorganotróficos, utilizan azúcares, alcoholes y sales inorgánicas para crecer (Cann, 2007).

Del análisis estadístico de Tukey al 5 %, se concluye que, los soportes formaron cuatro rangos de significación, Cuadro 10, en donde, el primer rango se conformó por los soportes afrecho húmedo “AH” (s1) quien encabeza y sigue con tierra “Ti” (s5) y turba “T” (s6), mientras en el último o cuarto rango se ubica el suero modificado 4 “Se4” (s3), con un promedio de población de 19.14 ln(UFC \times l⁻¹), inferior a los 19.88 ln(UFC \times l⁻¹), presentado por el soporte turba “T” (s6) ubicado

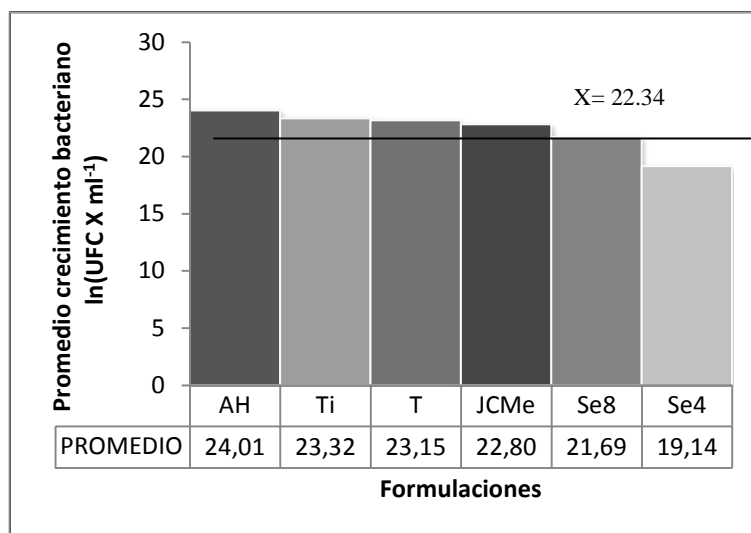
en el último rango de significación del análisis realizado a los 15 días, Cuadro 8, La disminución en la densidad poblacional se debe a que cuando las bacterias se siembran en el laboratorio, en medios de cultivo sólidos o líquidos, las condiciones se asemejan a las de un sistema cerrado, sin un aporte continuo de nutrientes. Si luego de sembrado el medio líquido se toman muestras a intervalos regulares, la representación gráfica de los datos (conteo de células viables vs. tiempo) dará la curva de crecimiento característica, que consta de 4 fases; de latencia, exponencial, estacionaria, y de muerte. (Prescott, 2002).

Después de alcanzar el mayor punto de producción de biomasa, la población se mantiene constante y comienza a disminuir debido a los limitantes nutricionales y las células pierden viabilidad. (Rojas, *et al*, 2013).

Cuadro 10.- Prueba de significación Tukey al 5% para la sobrevivencia de *Azotobacter spp* mantenida a 5 °C durante 45 días, en seis diferentes soportes. Tumbaco-Pichincha. 2013.

Soportes	Codificación	Promedio Ln (UFC x ml ⁻¹)	Relación con la población inoculada	Significación
s1	AH	24.01	1.03	a
s5	Ti	23.32	1.00	ab
s6	T	23.15	1.00	ab
s2	JCMe	22.80	0.98	b
s4	Se8	21.69	0.93	c
s3	Se4	19.14	0.82	d

Elaborado por: David Castro
Año: 2013.



Elaborado por: David Castro
Año: 2013.

Gráfico 2.- Sobrevivencia de *Azotobacter spp*, mantenida en diversos soportes durante 45 días a 5 °C. Tumbaco, Pichincha. 2013.

4.3.3 Influencia de los sustratos mantenidos a 5°C durante 90 días.

Del análisis de la variancia realizado, se calculó que existe diferencia altamente significativa entre los soportes estudiados en la sobrevivencia de *Azotobacter spp*, mantenido a 5°C durante 90 días. (Cuadro 11).

En las comparaciones ortogonales, se encontró diferencia altamente significativa para la evaluación entre los soportes sólidos, afrecho húmedo “AH” (s1), tierra “Ti” (s5) y turba “T” (s6), frente a los líquidos, Jugo de caña modificado “JCMe” (s2), suero modificado 4 “Se4” (s3) y suero modificado 8 “Se8” (s4), siendo los promedios de los soportes líquidos los que se imponen en la capacidad de dar albergue a la bacteria. Cuadro 11

Según, Mayea, *et al*, (1998), citado por Huilcapi, (2007). Las proteínas constituyen la mayoría de macromoléculas dentro de las células bacterianas. Se considera que aproximadamente el 90% de la masa de las células vivas es agua. Es decir que el medio líquido favoreció para que se establezcan en mayor densidad que en sólido.

A demás, se encuentra diferencias altamente significativas de la comparación entre el soporte afrecho húmedo “AH” (s1), con los soportes tierra “Ti” (s5) y turba “T” (s6), siendo estos dos últimos los que dan mejor hospedaje a la bacteria. Cuadro 11.

Cuadro 11.- Análisis de variancia de registros de sobrevivencia de *Azotobacter spp*, mantenida durante 90 días, en seis diferentes soportes a 5 °C. Tumbaco-Pichincha. 2013.

F de V	GL	SC	CM	Fcal
TOTAL	29			
SOPORTES	5	389.50	77.90	26.62**
s1vss5s6	1	338.16	338.16	151.70**
s2vss3s4	1	1.45	1.45	0.65ns
s3vss4	1	9.35	9.35	4.20*
s5vss6	1	0.08	0.08	0.03ns
s1s5s6 vs s2s3s4	1	40.46	40.46	18.15**
ERROR EXP.	24	70.24	2.93	
Promedio (ln)				21.58
Promedio real (expe) (UFC x ml ⁻¹)				2.24 x 10 ⁹
CV (%)				7.95
Elaborado por:	David Castro			
Año:	2013.			

A los 90 días, el afrecho húmedo “AH” que en las dos lecturas anteriores albergó de mejor manera a la bacteria, en esta vez decreció y se mostró como el menos alojador (Cuadro 12). Al igual que los demás fijadores de nitrógeno *Azotobacter spp*, es quimioheterótrofo, utiliza como fuente de carbono y energía una gran variedad de ácidos orgánicos, azúcares o sus derivados alcohólicos como el manitol que es el sustrato más empleado para aislarlos y cultivarlos, dentro las sustancias que se utilizan como fuente de carbono y energía se encuentra la fructosa, glucosa, sucrosa, acetato, fumarato, piruvato, succinato, acetilmetilcarbinol y α -oxoglutarato. (Holt, 2000, citado por Jiménez, 2007). Entonces hay muy poca cantidad de estos compuestos en la formulación de afrecho húmedo “AH”.

Por otro lado, a los 90 días el mejor soporte resultó ser la tierra “Ti” (S5), seguido por la turba “T” (S6), la cual en el primer período de evaluación se ubicó al final (Cuadro 8), La tierra o suelo según Vela (1974), tiene la capacidad de albergar a *Azotobacter spp*, un periodo de 10 a 15 años, es además uno de los soportes más utilizados para *Rhizobium spp*.(Moreno, *et al*, 2006; Catroux, *et al*, 2001)

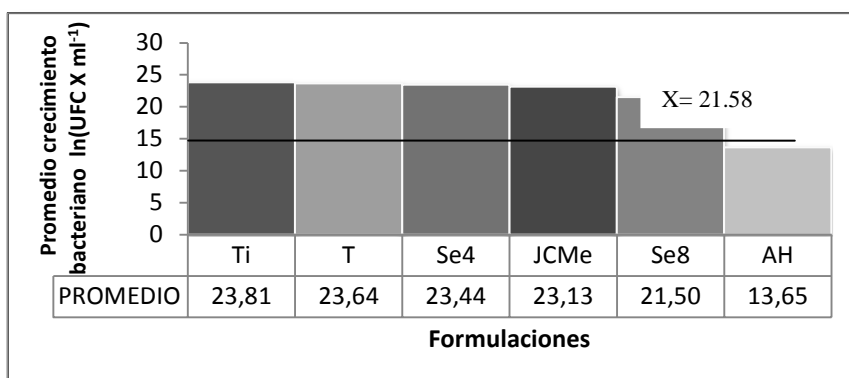
Así también, el soporte afrecho húmedo “AH” (s1), que en un inicio presentaba 1.06 veces más densidad bacteriana de la cepa en estudio inoculada, Cuadro 8, para los 90 días, menoró a 1.03 veces, Cuadro 12. Mientras que, en el soporte turba “T” (s6) se presentó un aumento en la relación de crecimiento de 0.86 veces, Cuadro 7, a 1.02 veces, Cuadro 13, este fenómeno en la población asegura la calidad del soporte, dada quizá por la capacidad de mantener el pH en un rango óptimo es decir de su capacidad buffer (Prescot, 2002).

Del análisis estadístico de Tukey al 5 %, se concluye que los soportes dieron cabida a cuatro rangos de significación, en donde, el primer rango se conformó por los soporte tierra “Ti” (s5), seguido por turba “T” (s6), y el suero modificado 4 “Se4” (Se4), y en el último o cuarto rango se ubica afrecho húmedo “AH” (s1). (Cuadro 12, Gráfico 3).

Cuadro 12.- Prueba de significación Tukey al 5% para la sobrevivencia de *Azotobacter spp* mantenida a 5°C durante 90 días, en seis diferentes soportes. Tumbaco-Pichincha. 2013

Soportes	Codificación	Promedio Ln (UFC x ml ⁻¹)	Relación con la población inoculada	Significación
s5	Ti	23.81	1.03	a
s6	T	23.64	1.02	ab
s3	Se4	23.44	1.01	ab
s2	JCMe	23.13	1.00	b
s4	Se8	21.50	0.93	c
s1	AH	13.65	0.59	d

Elaborado por: David Castro
Año: 2013.



Elaborado por: David Castro
Año: 2013.

Gráfico 3.- Sobrevivencia de *Azotobacter spp*, mantenida en diversos soportes a 5 °C durante 90 días. Tumbaco, Pichincha. 2013.

4.3.4 Influencia de los sustratos mantenidos a 20°C durante 15 días.

Del análisis de la variancia realizado en el estudio de la sobrevivencia de *Azotobacter spp*, mantenido a 20°C en un periodo de 15 días, en seis diferentes soportes, se detectó una diferencia altamente significativa para soportes. Cuadro 13.

De las comparaciones realizadas, se demuestra qué, los soportes sólidos, afrecho húmedo “AH” (s1), tierra “Ti” (s5) y turba “T” (s6), se imponen a los soportes líquidos; jugo de caña modificado “JCMe” (s2), suero modificado 4 “Se4” (s3) y suero modificado 8 “Se8” (s4) en la capacidad de albergar a la bacteria. Esta diferenciación se puede atribuir entre otros factores a la temperatura en estudio (20°C), ya que con una temperatura de 5°C la bacteria no presentó preferencia alguna por la consistencia de los soportes, al menos en los primeros 15 días (Cuadro 8).

El rango de temperatura requerido por las especies microbianas es determinando por la sensibilidad al calor en particular de enzimas, membranas, ribosomas y otros componentes, por lo general la temperatura óptima de crecimiento es similar a la registrada al ambiente en donde se ha desarrollado la población bacteriana. (Prescott, 2002)

Cuadro 13.- Análisis de variancia de registros de sobrevivencia de *Azotobacter spp*, mantenida a 20°C durante 15 días, en seis diferentes soportes. Tumbaco-Pichincha. 2013.

F de V	GL	SC	CM	Fcal
TOTAL	29			
SOPORTES	5	60.58	60.58	5.11**
s1vss5s6	1	1.09	1.09	0.46ns
s2vss3s4	1	0.32	0.32	0.14ns
s3vss4	1	42.45	42.45	17.90**
s5vss6	1	6.56	6.56	2.77ns
s1s5s6 vs s2s3s4	1	10.16	10.16	4.28*
ERROR EXP.	24	56.93	56.93	
Promedio (ln)				22.97
Promedio real (exp e) (UFC x ml ⁻¹)				9.45 x 10 ⁹
CV (%)				6.70

Elaborado por: David Castro
Año: 2013.

Con los registros de la sobrevivencia de *Azotobacter spp*, manifestada a los 15 días de inoculación en seis diferentes soportes a 20°C, Cuadro 14, se identificó a los soportes suero modificado 8 “Se8” (s4) y turba “T” (s6) con el mayor promedio, seguido de afrecho húmedo “AH” (s1), y con el menor promedio se tiene a suero modificado 4 “Se4” (s3).

Se muestra además, qué, el suero modificado 8 “Se8” (s3) y el soporte turba “T” (s6), dan una población cada uno de 1.06 veces más a la población inicialmente inoculada, Cuadro 14, por otro lado el soporte suero modificado 4 “Se4” (s3) presenta una reducción de la población con 0.88 veces menos de lo inoculado.

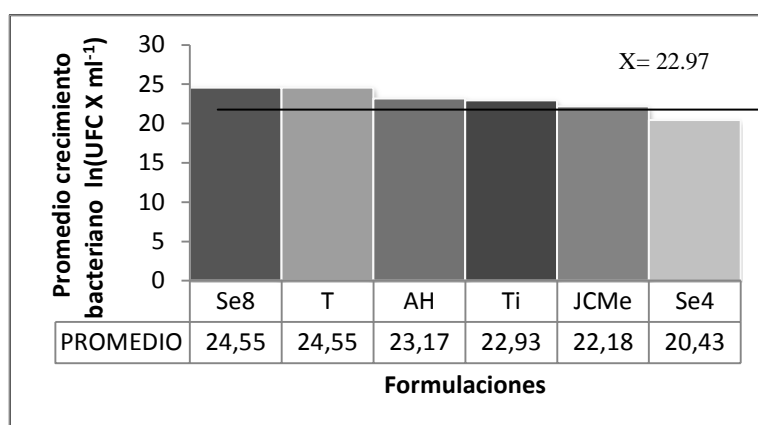
Al comparar los resultados que se presentaron con los mismos soportes a 5°C, Cuadro 8, aparece, el soporte turba “T” (s6), con el menor promedio, mientras a los 20°C este soporte se encuentra con el mayor promedio, (Cuadro 14, Gráfico 4).

Realizado el análisis de Tukey al 5%, indica que los soportes se dispusieron en cuatro rangos de significación, en donde, en el primer rango se ubica a los soportes; suero modificado 8 “Se8” (s4), y turba “T” (s6). En el último rango se encuentra suero modificado 4 “Se4” (s3). (Cuadro14).

Cuadro 14.- Prueba de significación y Tukey al 5% para la sobrevivencia de *Azotobacter spp*, mantenida a 20°C durante 15 días, en seis diferentes soportes. Tumbaco-Pichincha. 2013

Soportes	Codificación	Promedio ln (UFC x ml ⁻¹)	Relación con la población inoculada	Significación
s4	Se8	24.55	1.06	a
s6	T	24.55	1.06	a
s1	AH	23.17	1.00	b
s5	Ti	22.93	0.99	b
s2	JCMe	22.18	0.96	c
s3	Se4	20.43	0.88	d

Elaborado por: David Castro
Año: 2013.



Elaborado por: David Castro
Año: 2013.

Gráfico 4.- Sobrevivencia de *Azotobacter spp*, mantenida en diversos soportes durante 15 días a 20°C. Tumbaco, Pichincha. 2013.

4.3.5 Influencia de los sustratos mantenidos a 20°C durante 45 días.

Del análisis de la variancia realizado a la sobrevivencia de *Azotobacter spp*, en seis diferentes soportes a 20°C durante 45 días, nos indica que los soportes tiene una diferencia altamente significativa. Cuadro 15.

De las comparaciones, se demuestra que hay una diferencia altamente significativa entre soportes, en donde se imponen los soportes sólidos frente a los líquidos, repitiéndose lo sucedido hasta los 15 bajo las mismas condiciones.

Siguiendo el análisis con diferencia significativa, los soportes tierra “Ti” (s5) y turba “T” (s6), se imponen al soporte afrecho húmedo “AH” (s1). Por otro lado entre los soportes líquidos,

encontramos a jugo de caña modificado “JCMe” (s2), que se impone, a suero modificado 4 “Se4” (s3) y suero modificado 8 “Se8” (s4). Cuadro 15.

El promedio de 6.11×10^9 UFC x ml^{-1} resulta mayor al reportado por Estrada, *et al*, (2009), quienes lo reportan adecuado desde 1×10^8 UFC x ml^{-1} , para bacterias como *Rhizobium* y *Azospirillum* en investigaciones similares a esta temperatura.

Cuadro 15.- Análisis de variancia de registros de sobrevivencia de *Azotobacter spp*, mantenida a 20°C durante 45 días, en seis diferentes soportes. Tumbaco-Pichincha. 2013.

F de V	GL	SC	CM	Fcal
TOTAL	29			
SOPORTES	5	100.49	20.10	6.61**
s1vss5s6	1	16.59	16.59	7.00*
s2vss3s4	1	33.55	33.55	14.14**
s3vss4	1	1.58	1.58	0.67ns
s5vss6	1	0.00	0.00	0.00ns
s1s5s6 vs s2s3s4	1	48.78	48.78	20.56**
ERROR EXP.	24	72.92	3.04	
Promedio (ln)				22.53
Promedio real (exp e) (UFC x ml^{-1})				6.11×10^9
CV (%)				7.73
Elaborado por:	David Castro			
Año:	2013.			

En el estudio de sobrevivencia de *Azotobacter spp*, inoculado en seis diferentes soportes durante 45 días a 20°C, se registró que la población bacteriana del soporte turba “T” (s6), y suero modificado 4 “Se4” (s3), que se muestra, en el, Cuadro 16, es igual a la registrada a los 15 días a 20 °C, según se indica, en el, Cuadro 14. Por lo que tal vez, los soportes tienen una capacidad a esta temperatura de mantener a la población bacteriana estable al menos hasta los 45 días.

Para el soporte suero modificado 8 “Se8” (s4), se registra un promedio en la densidad bacteriana a los 45 días, Cuadro 16, de 0.85 ln UFC x ml^{-1} , que resulta menor al promedio que se registró a los 15 días, según se muestra, en el, Cuadro 14, 1.06 ln UFC x ml^{-1} . La disminución de la población bacteriana depende de factores como la formulación que en este caso brindó las condiciones para que la población bacteriana se multiplique de manera acelerada y se reduzca el crecimiento, que tal vez, sea un indicativo de la calidad de formulación del soporte. Que según, Bending *et al*, (2002), menciona a la calidad bioquímica del substrato y la viabilidad física de sus componentes como una llave determinante en los procesos de descomposición en el suelo.

Sin embargo, todos los soportes han mostrado la capacidad para prestar las condiciones requeridas por la bacteria para mantener una población efectiva para su mantención, Cuadro 16.

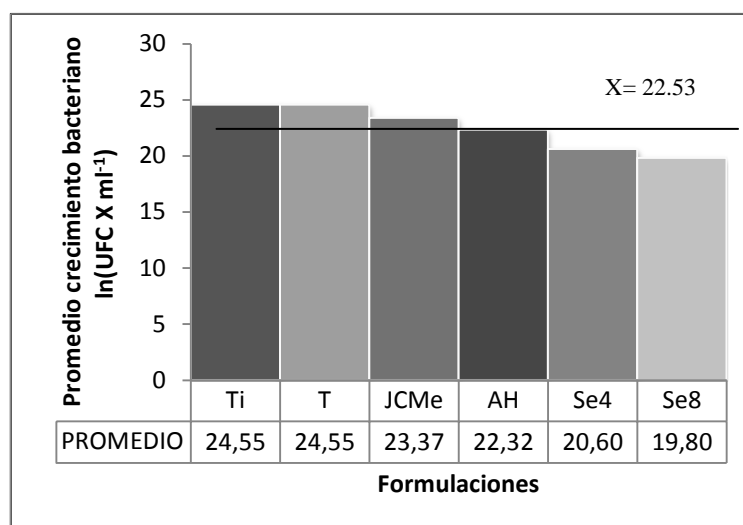
El Oxígeno es un factor limitante en la fijación de nitrógeno debido a que suprime el complejo nitrogenasa, *Azotobacter* supera este problema debido a que tiene la tasa más alta de respiración de cualquier microorganismo, manteniendo así un bajo nivel de oxígeno en sus células, aspecto importante en la elección como promotor de crecimiento. (Gnanamanickman, 2006 citado por Ngoma. *et al*, 2012). Y mecanismo que lo beneficia para mantener su población en condiciones in vitro.

Con una diferenciación al 5% mediante prueba de Tukey, para los soportes, resulto en la conformación de cinco rangos de significación. En el primer rango de significación se tiene a los soportes tierra “Ti” (s5) y turba “T” (s6), y en el quinto rango se ubica suero modificado 8 “Se8” (s4), (Cuadro 16, Gráfico 5).

Cuadro 16.- Prueba de significación y Tukey al 5% para la sobrevivencia de *Azotobacter spp*, mantenida a 20°C durante 45 días, en seis diferentes soportes. Tumbaco-Pichincha. 2013

Soportes	Codificación	Promedio $\ln(\text{UFC} \times \text{ml}^{-1})$	Relación con la población inoculada	Significación
s5	Ti	24.55	1.06	a
s6	T	24.55	1.06	a
s2	JCMe	23.37	1.01	b
s1	AH	22.32	0.96	c
s3	Se4	20.60	0.89	d
s4	Se8	19.80	0.85	e

Elaborado por: David Castro
Año: 2013.



Elaborado por: David Castro
Año: 2013.

Gráfico 5.- Sobrevivencia de *Azotobacter spp* a 20°C mantenida en diversos soportes durante 45 días. Tumbaco, Pichincha. 2013.

4.3.6 Influencia de los sustratos mantenidos a 20°C durante 90 días.

Del análisis de la variancia realizado se reporta que existe una diferencia altamente significativa para los soportes que dieron albergue a *Azotobacter spp*, a 20 °C durante 90 días. Cuadro 17.

También, de las comparaciones realizadas, se encuentra que, no hay diferencia entre los soportes sólidos frente a los líquidos después de los 90 días, Cuadro 17, en forma contraria a lo registrado en el transcurso de los primeros 45 días donde los soportes sólidos se impusieron a los líquidos en la mantención de *Azotobacter spp*. (Cuadro 15).

Además existe una diferencia significativa entre sólidos en donde, tierra “Ti” (s5), y turba “T” (s6), se imponen al afrecho húmedo “AH”. En tanto que entre los soportes líquidos existe una diferencia altamente significativa, en la que, el jugo de caña modificado “JCMe” (s2), se impone a suero modificado 4 “Se4” (s3), y al suero modificado 8 “Se8” (s4); y de estos dos últimos con una diferencia altamente significativa se destaca el suero modificado 4 “Se4” (s3). Cuadro 17.

Cuadro 17.- Análisis de variancia de registros de sobrevivencia de *Azotobacter spp*, mantenida a 20°C durante 90 días, en seis diferentes soportes. Tumbaco-Pichincha. 2013.

F de V	GL	SC	CM	Fcal
TOTAL	29			
SOPORTES	5	89.43	17.88	4.62**
s1 vs s5s6	1	11.39	11.39	4.80*
s2 vs s3s4	1	19.93	19.93	8.40**
s3 vs s4	1	51.58	51.58	21.74**
s5 vs s6	1	0.18	0.18	0.08ns
s1s5s6 vs s2s3s4	1	6.36	6.36	2.68ns
ERROR EXP.	24	92.95	3.87	
Promedio (ln)			19.54	
Promedio real (expe) (UFC x ml ⁻¹)			3.06 x 10 ⁸	
CV (%)			10.07	
Elaborado por:	David Castro			
Año:	2013.			

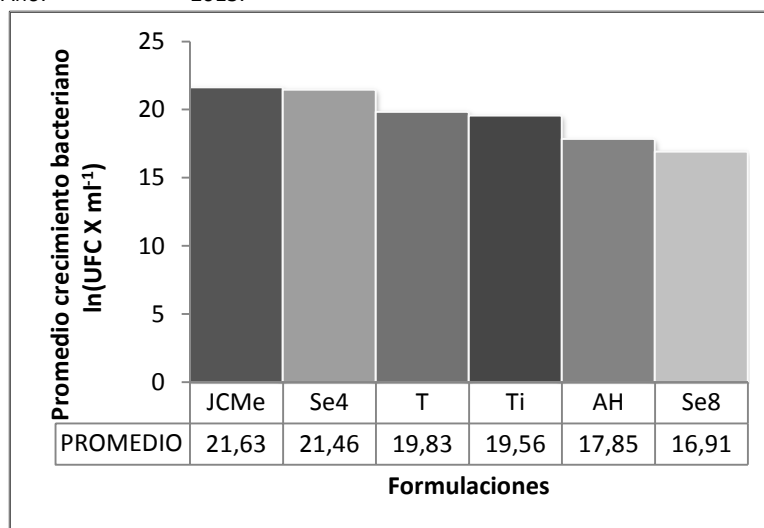
De los promedios de la población de *Azotobacter spp*, presente en los seis diferentes soportes mantenidos a 20°C, durante 90 días, (Cuadro 18) se encuentra que la población ha disminuido, a excepción del soporte jugo de caña modificado “JCMe” (s2), el cual se destaca, por tener al final de los 90 días, una población mayor a la registrada a los 15 días (Cuadro 14).

Después de realizada la prueba de diferenciación al 5% de Tukey, para los soportes en estudio, se detectó cuatro rangos de significación estadística, en el primer rango se encuentra encabezando el soporte jugo de caña modificado “JCMe” (s2) seguido por el suero modificado 4 “Se4” (s3) en tanto que en el último o cuarto rango se ubica el suero modificado 8 “Se8” (s4). (Cuadro 18, Gráfico 6).

Cuadro 18.- Prueba de significación Tukey al 5%, para la sobrevivencia de *Azotobacter spp*, mantenida a 20°C durante 90 días, en seis diferentes soportes. Tumbaco-Pichincha. 2013.

Soportes	Codificación	Promedio $\ln(\text{UFC} \times \text{ml}^{-1})$	Relación con la población inoculada	Significación
s2	JCMe	21.63	0.93	a
s3	Se4	21.46	0.92	a
s6	T	19.83	0.85	b
s5	Ti	19.56	0.84	b
s1	AH	17.85	0.77	c
s4	Se8	16.91	0.73	d

Elaborado por: David Castro
Año: 2013.



Elaborado por: David Castro
Año: 2013.

Gráfico 6.- Sobrevivencia de *Azotobacter spp* mantenida en diversos soportes durante 90 días a 20°C. Tumbaco, Pichincha. 2013.

4.3.7 Influencia de los sustratos mantenidos a 30°C durante 15 días.

Del análisis de la variancia, realizado en el presente estudio se identifica, una diferencia estadística significativa entre los seis soportes evaluados, su capacidad de albergar a la bacteria en un periodo de 15 días, a una temperatura de 30°C.

Con la comparación de los soportes sólidos frente a los líquidos, Cuadro 19, y del análisis de los promedios, Cuadro 20, se impone con diferencia significativa, los soportes líquidos.

Cuadro 19.- Análisis de variancia de registros de sobrevivencia de *Azotobacter spp*, mantenida a 30°C durante 15 días, en seis diferentes soportes. Tumbaco-Pichincha. 2013.

F de V	GL	SC	CM	Fcal
TOTAL	29			
SOPORTES	5	105.36	21.07	3.70*
s1 vs s5s6	1	63.17	63.17	11.10**
s2 vs s3s4	1	4.48	4.48	0.79ns
s3 vs s4	1	2.38	2.38	0.42ns
s5 vs s6	1	6.75	6.75	1.19ns
s1s5s6 vs s2s3s4	1	28.57	28.57	5.02*
ERROR EXP.	24	136.65	5.69	
Promedio (ln)				20.46
Promedio real (expe) (UFC x ml ⁻¹)				7.67 x 10 ⁸
CV (%)				11.66

Elaborado por: David Castro
Año: 2013.

De acuerdo al, Cuadro 20, de los promedios de población de *Azotobacter spp*, registrada en seis diferentes soportes, mantenidos a temperatura controlada de 30°C durante 15 días, se ubica al soporte jugo de caña modificado “JCMe” (s2), como el mayor promedio de densidad bacteriana, seguido del soporte turba “T” (s6), y con un promedio en densidad poblacional menor por parte del afrecho húmedo “AH” (s1).

Sin embargo, al comparar el análisis de la población inicialmente inoculada, a la población registrada después de 15 días, se produjo un decrecimiento que va desde 0.96 veces con jugo de caña modificado “JCMe” (s2), a 0.71 veces con afrecho húmedo “AH” (s1). Cuadro 20.

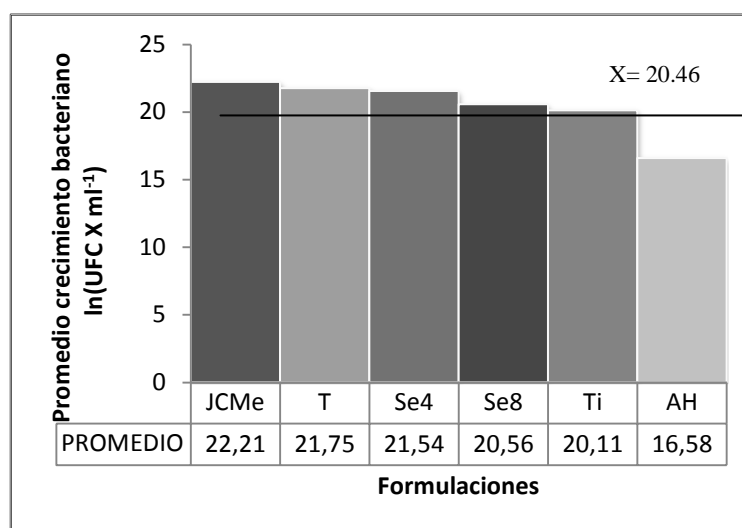
Cabe destacar, además que la mayor población promedio registrada, Cuadro 20, Gráfico 7, jugo de caña modificado “JCMe” (s2), 0.96 veces, es menor a las mayores poblaciones promedio registradas en la evaluación a los 5°C, Cuadro 8 y a los 20°C, Cuadro 14. Es decir que ha esta temperatura (30°C) la población bacteriana disminuye quizá debido a que los microorganismos tienen una elevada actividad fisiológica, que les obliga a consumir con celeridad los compuestos presentes en cada uno de los soportes y por ende se manifiesta en la reducción de su población. (Brock, et al, 2001; Espín, 2004).

Después de realizada la prueba de diferenciación al 5% de Tukey, para los soportes en estudio, se detectó tres rangos de significación estadística, en el primer rango se encuentra encabezando el soporte Jugo de caña modificado “JCMe” (s2), seguido de turba “T” (s6) y suero modificado 4 “Se4” (s3), en tanto que en el último o tercer rango se presenta, afrecho húmedo “AH” (s1). Cuadro 20.

Cuadro 20.- Prueba de significación Tukey al 5%, para la sobrevivencia de *Azotobacter spp*, mantenida a 30°C durante 15 días, en seis diferentes soportes. Tumbaco-Pichincha. 2013.

Soportes	Codificación	Promedio $\ln(\text{UFC} \times \text{ml}^{-1})$	Relación con la población inoculada	Significación
s2	JCMe	22.21	0.96	a
s6	T	21.75	0.94	a
s3	Se4	21.54	0.93	a
s4	Se8	20.56	0.89	b
s5	Ti	20.11	0.87	b
s1	AH	16.58	0.71	c

Elaborado por: David Castro
Año: 2013.



Elaborado por: David Castro
Año: 2013.

Gráfico 7.- Sobrevivencia de *Azotobacter spp*, mantenida en diversos soportes durante 15 días a 30°C. Tumbaco, Pichincha. 2013.

4.3.8 Influencia de los sustratos mantenidos a 30°C durante 45 días.

Del análisis de la variancia realizado a los datos de sobrevivencia de *Azotobacter spp*, mantenida a 30 °C durante 45 días, Cuadro 21, da una diferencia de los soportes altamente significativa.

Con la comparación realizada entre los soportes sólidos, se imponen con alta diferenciación estadística los soportes tierra “Ti” (s5), y turba “T” (s6), al soporte afrecho húmedo “AH” (s1). Y se impone el soporte tierra “Ti” (s5), a turba “T” (s6). Cuadro 21

De las comparaciones entre los soportes líquidos, solo se impone significativamente el soporte suero modificado 8 “Se8” (s4), al suero modificado 4 “Se4” (s3). Cuadro 21

Cuadro 21.- Análisis de variancia de registros de sobrevivencia de *Azotobacter spp*, mantenida a 30°C durante 45 días, en seis diferentes soportes. Tumbaco-Pichincha. 2013.

F de V	GL	SC	CM	Fcal
TOTAL	29			
SOPORTES	5	170.73	34.15	6.08**
s1 vs s5s6	1	73.26	73.26	12.87**
s2 vs s3s4	1	0.89	0.89	0.16ns
s3 vs s4	1	37.00	37.00	6.50*
s5 vs s6	1	54.65	54.65	9.60**
s1s5s6 vs s2s3s4	1	4.94	4.94	0.87ns
ERROR EXP.	24	134.71	5.61	
Promedio (ln)				20.84
Promedio real (expe) (UFC x ml ⁻¹)				1.13 x 10 ⁹
CV (%)				11.37
Elaborado por:	David Castro			
Año:	2013.			

De acuerdo, al, Cuadro 22, de los promedios de población de *Azotobacter spp*, registrada en seis diferentes soportes, mantenidos a temperatura controlada de 30°C durante 45 días, se ubica con el mayor promedio bacteriano al soporte tierra “Ti” (s5); y con el promedio más bajo se encuentra el soporte afrecho húmedo “AH” (s1).

Así también con los mismos datos promedio registrados, Cuadro 22, se destaca que, tanto la tierra “Ti” (s5), como el suero modificado 8 “Se8” (s4), presentaron un incremento que les permitió ubicarse como primero y segundo mejor promedio respectivamente, en comparación con la población bacteriana registrada en los primeros 15 días. (Cuadro 22, Gráfico 8)

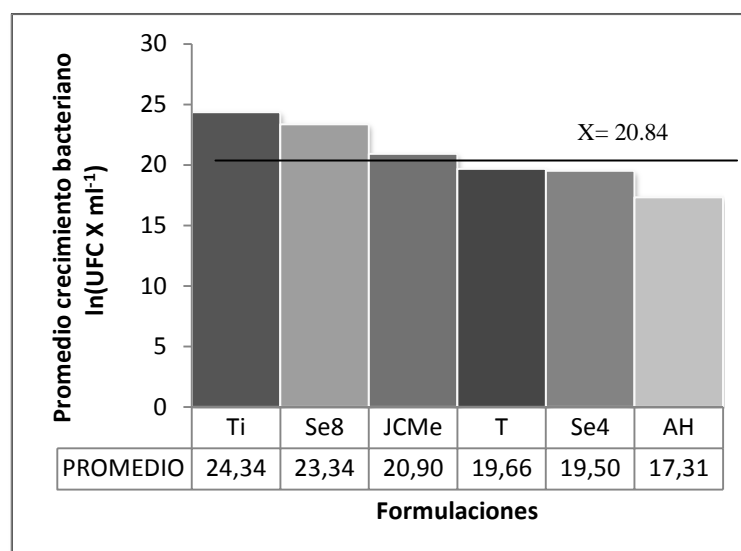
También, al comparar los promedios de la población registrada a los 15 días, Cuadro 20, con la población registrada a los 45 días, Cuadro 22, hubo un incremento de la población bacteriana en los soportes, suero modificado 8 “Se8” (Se8), tierra “Ti” (s5) y afrecho húmedo “AH” (s1). Este incremento es quizá porque aun los recursos presentes en los soportes dan las condiciones necesarias para el incremento en la población. Y como lo menciona Brock, et al, (2001) los microorganismos del suelo dependen entre otras condiciones a los cambios que se producen en el medio como temperatura, contenido de agua, y viabilidad nutricional.

Con la prueba de Tukey al 5%, Cuadro 22, se conformó cinco rangos de significación estadística, en donde el soporte tierra “Ti” (s5) se destaca con el primer rango, en tanto que en el mínimo rango se ubica al soporte Afrecho húmedo “AH” (s1).

Cuadro 22.- Prueba de significación Tukey al 5% para la sobrevivencia de *Azotobacter spp* mantenida a 30°C durante 45 días, en seis diferentes soportes. Tumbaco-Pichincha. 2013.

Soportes	Codificación	Promedio $\ln(\text{UFC} \times \text{l}^{-1})$	Relación con la población inoculada	Significación
s5	Ti	24.34	1.05	a
s4	Se8	23.34	1.01	b
s2	JCMe	20.90	0.90	c
s6	T	19.66	0.85	d
s3	Se4	19.50	0.84	d
s1	AH	17.31	0.75	e

Elaborado por: David Castro
Año: 2013.



Elaborado por: David Castro
Año: 2013.

Gráfico 8.- Sobrevivencia de *Azotobacter spp*, mantenida en diversos soportes durante 45 días a 30°C. Tumbaco, Pichincha. 2013.

4.3.9 Influencia de los sustratos mantenidos a 30°C durante 90 días.

Del análisis de la variancia realizado a los registros de sobrevivencia tomados de los diferentes soportes mantenidos por 90 días a una temperatura constante de 30 °C, Cuadro 23, indican que los soportes presentan una diferencia altamente significativa, y que de las comparaciones realizadas únicamente entre los soportes líquidos se impone, el soporte jugo de caña modificado “JCMe” a los soportes suero modificado 8 “Se8” (s4) y suero modificado 4 “Se4” (s3).

Cuadro 23.- Análisis de variancia de registros de sobrevivencia de *Azotobacter spp*, mantenida a 30°C durante 90 días, en seis diferentes soportes. Tumbaco-Pichincha. 2013.

F de V	GL	SC	CM	Fcal
TOTAL	29			
SOPORTES	5	103.54	20.71	4.38**
s1 vs s5s6	1	2.07	2.07	0.36ns
s2 vs s3s4	1	74.49	74.49	13.08**
s3 vs s4	1	7.71	7.71	1.35ns
s5 vs s6	1	0.27	0.27	0.05ns
s1s5s6 vs s2s3s4	1	19.01	19.01	3.34ns
ERROR EXP.	24	113.37	4.72	
Promedio (ln)				19.20
Promedio real (expe) ($ufc \times ml^{-1}$)				2.1×10^8
CV (%)				11.31

Elaborado por: David Castro
Año: 2013.

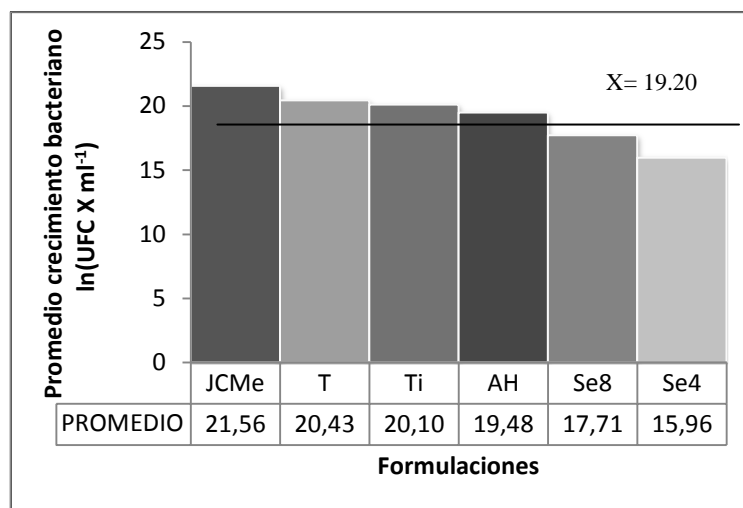
En la evaluación del desarrollo microbiano realizado a seis soportes durante un período de 90 días mantenidos a una temperatura constante de 30°C, Cuadro 24, se muestra que el mejor promedio está dado por el soporte jugo de caña modificado “JCMe” (s2) con 0.93 ln (UFC x ml⁻¹), seguido de turba “T” (s6) con 0.88 ln (UFC x ml⁻¹), y con el menor promedio se ubica el soporte suero modificado 8 “Se8” (s4) con 0.69 veces menos ln (UFC x ml⁻¹). Los soportes muestran una disminución de la población bacteriana inoculada en cada uno de los soportes, Cuadro 24, que va desde 0.69 veces (s4), hasta 0.93 veces (s2). (Gráfico 9)

En la prueba de Tukey al 5% del comportamiento de los soportes mantenidos a 30 °C un período de 90 días, se conformó cinco rangos de significación de donde encabeza el primer rango el soporte jugo de caña modificado “JCMe” (s2), y en el último rango de significación se encuentra el soporte suero modificado 4 “Se4” (s3).

Cuadro 24.- Prueba de significación Tukey al 5% para la sobrevivencia de *Azotobacter spp*, mantenida a 30°C durante 90 días, en seis diferentes soportes. Tumbaco-Pichincha. 2013.

Soportes	Codificación	Promedio ln(UFC × l ⁻¹)	Relación con la población inoculada	Significación
s2	JCMe	21.56	0.93	a
s6	T	20.43	0.88	a b
s5	Ti	20.10	0.87	b c
s1	AH	19.48	0.84	c
s4	Se8	17.71	0.76	d
s3	Se4	15.96	0.69	e

Elaborado por: David Castro / Año: 2013.



Elaborado por: David Castro
Año: 2013.

Gráfico 9.- Sobrevivencia de *Azotobacter spp* a 30°C mantenida en diversos soportes durante 90 días. Tumbaco, Pichincha. 2013.

4.3.10 Influencia de los sustratos a través del tiempo

En esta fase del estudio se identificó, que *Azotobacter spp*, presento diferente comportamiento en cuanto a sobrevivencia en la acción reciproca de los factores en estudio, tanto en la particularidad de los soportes, como en la condición ambiental a la que fueron sometidos, según el registro de población, se muestra, en el, Cuadro 25, que los promedios de crecimiento bacteriano registrado y calculado aparecen con una relación de la población inicialmente inoculada (2×10^8 UFC x ml⁻¹), que va desde un incremento de 1.25 veces (JCMc + 5°C) a un decremento de 0.93 veces (AH + 30°C).

Se destaca que la selección de los soportes resultó favorable debido al aumento poblacional registrado en los 16 primeros tratamientos de los 18 estudiados que se muestran en el Cuadro 25, Gráfico 10. El tratamiento t4 (jugo de caña modificado a 5 °C) con un promedio de 2.29×10^{10} UFC x ml⁻¹ y una relación de 1.25 a la población inicialmente inoculada, tiene el mayor promedio, seguido del tratamiento t13 (tierra a 5°C) con un promedio de 1.54×10^{10} UFC x ml⁻¹, y el tratamiento que brindo las más bajas condiciones para que *Azotobacter spp* pueda ser albergado es t2 (afrecho húmedo a 30°C), con un promedio de 5.32×10^7 UFC x ml⁻¹.

Hay una serie de factores ambientales que afectan a la comunidad bacteriana. Algunos de estos factores son los llamados moduladores (Balser *et al*, 2009). De los cuales se puede mencionar la temperatura, pH, salinidad del agua, entre otros. Los cuales se relacionan con el desarrollo de las bacterias como lo mencionado por Frioni (1999) quien indica que *Penicillium* por ejemplo abunda en climas templados y fríos, Las Cyanobacterias es común encontrarlas en suelos alcalinos y neutros pero raramente en condiciones de acidez.

Esta variación en el crecimiento de *Azotobacter spp*, podría ser entre otras a las formulaciones de cada uno de los soportes evaluados, los cuales favorecieron, según menciona, Bashan, (1998) para que se produzcan las reacciones propias del microorganismo enfocadas en; a) obtener energía química del entorno, almacenarla, para utilizar luego en diferentes funciones celulares, b) convertir los nutrientes exógenos en unidades precursoras de los componentes macromoleculares de la célula bacteriana, c) formar y degradar moléculas necesarias para funciones celulares específicas.

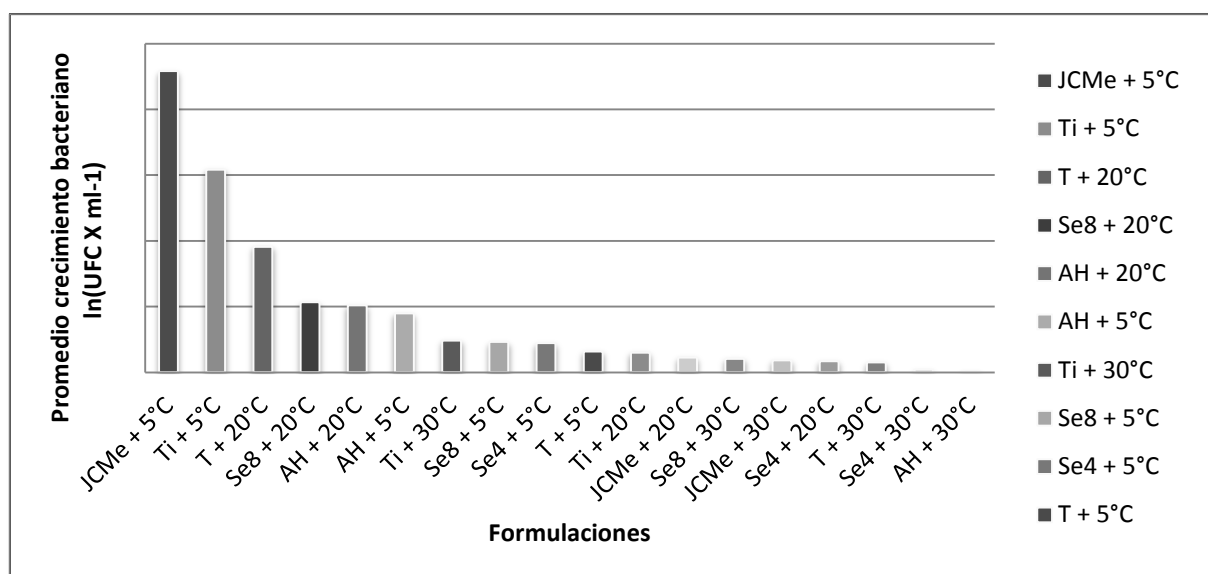
En estudios de *Azotobacter spp*, se menciona que no produce endosporas sino que forma quistes de paredes gruesas, como parte de su ciclo vital. Estos quistes son resistentes a la desecación, a ciertos

productos químicos deletéreos y a factores ambientales adversos. En condiciones ambientales favorables, los quistes germinan y crecen en las células vegetativas (Crum, 2004, Orville, *et al*, 1961)

Cuadro 25.- Promedio de evaluación de soportes para el mantenimiento de *Azotobacter spp*, a diferentes condiciones ambientales en laboratorio. Tumbaco-Pichincha, 2013.

Trat.	Codificación	Descripción	Promedio (UFC \times ml ⁻¹)	Relación con la población inoculada
t4	s2t1	JCMe + 5°C	2.29x10 ¹⁰	1.25
t13	s5t1	Ti + 5°C	1.54x10 ¹⁰	1.23
t18	s6t3	T + 20°C	9.53x10 ⁹	1.20
t12	s4t3	Se8 + 20°C	5.32x10 ⁹	1.17
t3	s1t3	AH + 20°C	5.08x10 ⁹	1.17
t1	s1t1	AH + 5°C	4.47x10 ⁹	1.16
t14	s5t2	Ti + 30°C	2.40x10 ⁹	1.13
t10	s4t1	Se8 + 5°C	2.30x10 ⁹	1.13
t7	s3t1	Se4 + 5°C	2.21x10 ⁹	1.13
t16	s6t1	T + 5°C	1.57x10 ⁹	1.11
t15	s5t3	Ti + 20°C	1.48x10 ⁹	1.10
t6	s2t3	JCMe + 20°C	1.11x10 ⁹	1.09
t11	s4t2	Se8 + 30°C	1.01x10 ⁹	1.08
t5	s2t2	JCMe + 30°C	8.97x10 ⁸	1.08
t9	s3t3	Se4 + 20°C	8.31x10 ⁸	1.07
t17	s6t2	T + 30°C	7.41x10 ⁸	1.07
t8	s3t2	Se4 + 30°C	1.78x10 ⁸	0.99
t2	s1t2	AH + 30°C	5.32x10 ⁷	0.93

Elaborado por: David Castro
Año: 2013.



Elaborado por: David Castro
Año: 2013

Gráfico 10.- Promedio de evaluación de soportes para el mantenimiento de *Azotobacter spp.* a diferentes condiciones ambientales en laboratorio. Tumbaco-Pichincha, 2013

Al estudiar la influencia de seis diferentes formulaciones o soportes inoculados con *Azotobacter spp.* y expuestos a tres temperaturas distintas, en la densidad poblacional existente según los muestreos periódicos realizados en el transcurso de los 90 días, a los diferentes tratamientos, identificamos con el análisis de la variancia realizado, Cuadro 26, que hay una diferencia altamente significativa para soportes y significativa para temperatura, es decir según lo reportado por Raja, (2010), y Revillas *et al*, (2001) indican que una misma cepa de *Azotobacter spp.* tuvo diferente comportamiento o adaptación en los medios a los que fue sometida, debido a la capacidad intrínseca del paquete genético presente en ella, para obtener energía, degradar exógena e internamente compuestos constitutivos celulares, y soportar los desechos celulares generados en los propios procesos biológicos.

También para el albergue de la bacteria, la composición propia de cada uno de los soportes en estudio, demostró que intrínsecamente son muy diferentes, debido a que, la adaptación de un microorganismo está ligada a factores del medio, como disponibilidad de fuentes de carbono, agua, concentración de oxígeno, acceso a minerales, capacidad buffer (Loredo *et al*, 2007).

De la influencia de la temperatura con el desarrollo microbiano se desprende que; tiene una correlación con la tasa de respiración y con el contenido de humedad (Bonilla, *et al*, (2009), que se traduce en la actividad biológica celular (Pettersson, M 2004), y en el aumento de consumo de los nutrientes. Para Pettersson, (2004) las bacterianas del suelo se desarrollan en temperaturas mínimas de -10 °C y máximas de 45 °C con la temperatura óptima de entre los 25 y 30°C. Cuadro 26.

En cuanto al tiempo de conservación propuesto de 90 días, respecto a la población bacteriana registrada, se destaca que todos los tratamientos presentan un promedio mayor al recomendado por, Corvalán *et al*, (2006), Vélez (2010), Vásquez, (2011).

Menciona, Santillana, (2006) en *Pseudomonas sp* que el inoculante fue similar hasta los 3 meses de conservación.

Cuadro 26.- Análisis de la variancia en la evaluación de soportes para el mantenimiento de *Azotobacter spp.* a diferentes condiciones ambientales. Tumbaco-Pichincha, 2013.

F de V	GL	CM	
TOTAL	269		
TRATAMIENTOS	17	32,96	**
SOPORTES (S)	5	58,83	**
s1 vs s5s6	1	28,23	*
s2 vs s3s4	1	17,60	ns
s3 vs s4	1	1,01	ns
s5 vs s6	1	1,51	ns
s1s5s6 vs s2s3s4	1	0,68	ns
TEMPERATURA (T)	2	98,28	*
t3vst1t2	1	5,19	ns
t1 vs t2	1	60,33	**
S x T	10	6,97	ns
ERROR EXP	252	7,85	
Promedio (ln)		0.13	
Promedio real (exp e) UFC x ml-1		1.86 x 10 ⁹	
CV (%)		13	
Elaborado por:	David Castro		
Año:	2013.		

Con la prueba de significación, Tukey al 5 %, se identificó nueve rangos de significación, donde se señala que t13 (Ti + 5°C) junto con t4 (JCMe + 5°C) son los dos tratamientos que brindaron las condiciones adecuadas para el desarrollo de *Azotobacter spp*, y entre estos dos tratamientos mayormente t13. El tratamiento t2 (Ah + 29°C) no cubrió con los requerimientos adecuados para dar albergue a la bacteria. Cuadro 27.

Cuadro 27.- Test de Tukey al 5 % para tratamientos en estudio de evaluación de soportes para el mantenimiento de *Azotobacter spp*, a diferentes condiciones ambientales. Tumbaco-Pichincha, 2013.

Trat.	Codificación	Descripción	Promedio UFC \times ml ⁻¹	Significación		
t13	s5t1	Ti + 5°C	2.29 \times 10 ¹⁰	a		
t4	s2t1	JCMe + 5°C	1.54 \times 10 ¹⁰	a	b	
t18	s6t3	T + 20°C	9.53 \times 10 ⁹		b	
t12	s4t3	Se8 + 20°C	5.32 \times 10 ⁹		c	
t3	s1t3	AH + 20°C	5.08 \times 10 ⁹		c	
t1	s1t1	AH + 5°C	4.47 \times 10 ⁹		c	
t14	s5t2	Ti + 29°C	2.40 \times 10 ⁹		d	
t10	s4t1	Se8 + 5°C	2.30 \times 10 ⁹		d	
t7	s3t1	Se4 + 5°C	2.21 \times 10 ⁹		d	
t16	s6t1	T + 5°C	1.57 \times 10 ⁹	d	e	
t15	s5t3	Ti + 20°C	1.48 \times 10 ⁹	d	e	f
t6	s2t3	JCMe + 20°C	1.11 \times 10 ⁹		e	f g
t11	s4t2	Se8 + 29°C	1.01 \times 10 ⁹		e	f g
t5	s2t2	JCMe + 29°C	8.97 \times 10 ⁸		f	g
t9	s3t3	Se4 + 20°C	8.31 \times 10 ⁸		f	g
t17	s6t2	T + 29°C	7.41 \times 10 ⁸			g
t8	s3t2	Se4 + 29°C	1.78 \times 10 ⁸			h
t2	s1t2	AH + 29°C	5.32 \times 10 ⁷			I

Elaborado por: David Castro
Año: 2013.

En las comparaciones de temperatura, encontramos que entre los 5 °C y los 30 °C hay una diferencia muy importante que se confirma en las prueba de Tukey al 5% realizada, Cuadro 28, que indica hay dos rangos siendo el primero a los 5 °C y 20°C, y el segundo a los 30 °C.

Puede ser que la tasa de respiración de *Azotobacter spp* a bajas temperaturas disminuyó, y esto contribuyó a que los procesos metabólicos bacterianos generen menos cantidad de contaminantes, así como también se disminuya el aprovechamiento de los nutrientes presentes en los soportes, y que la contaminación del medio por parte de los residuos generados en los procesos de anabolismo y catabolismo celular, no lleguen a ser tóxicos para la población microbiana presente.

La baja temperatura también disminuyó la evaporación del agua presente en los soportes, contribuyendo a que la bacteria disponga de este recurso en los diferentes procesos metabólicos.

El pH de los medios de cultivo es generalmente modificado por los microorganismos que crecen en él. El consumo de las fuentes de carbono como glucosa o sacarosa da como resultado la producción de ácidos orgánicos que acidifican el pH del medio. (Holguin, 2008). Dependiendo de las fuentes de energía y del metabolismo de cada género bacteriano, el medio puede acidificarse o alcalinizarse. Existen mecanismos desarrollados por algunas bacterias que les permiten sobrevivir a este tipo de cambio, así, pueden sintetizar nuevas proteínas como respuesta de tolerancia a distintos medios (Brock, *et al*, 2001).

Cuadro 28.- Test de Tukey al 5% para temperatura en estudio de evaluación de soportes para el mantenimiento de *Azotobacter spp*, a diferentes condiciones ambientales. Tumbaco-Pichincha, 2013.

temperatura	Descripción	Promedio UFC \times ml ⁻¹	Significación
t1	5°C	22.17	a
t3	20°C	21.68	a
t2	30°C	20.17	b
Elaborado por: Año: David Castro 2013.			

En el test de Tukey al 5%, Cuadro 29, se indica que se constituyen tres rangos de significación, identificándose en el primer rango a los soportes “Ti”, “JCMe” y “T” que resultaron ser los que mejores condiciones brindaron para el desarrollo de la bacteria, siendo más eficiente el soporte “Ti”. Los soportes que no brindaron las mejores condiciones son “Se4” y “AH”, ubicándose “AH” como el menos eficiente.

Cuadro 29.- Test de Tukey al 5% de soportes para el mantenimiento de *Azotobacter spp*, a diferentes condiciones ambientales. Tumbaco-Pichincha, 2013.

Soportes	Descripción	Promedio UFC \times ml ⁻¹	Significación
s5	Ti	22.6	a
s2	JCMe	22.5	a
s6	T	21.9	a
s4	Se8	20.9	b
s3	Se4	20.3	b c
s1	AH	19.9	c

Elaborado por:
Año: David Castro
2013.

4.4 Fase de invernadero

Se preseleccionó en esta etapa a los primeros tres tratamientos del estudio en sobrevivencia y capacidad de albergar a *Azotobacter spp* por parte de soportes en algunas condiciones de temperatura, que diferenciados en la prueba de Tukey al 5% Cuadro 36, se ubican en el primero y segundo rango de significación, t3 (tierra a 5°C), t4 (jugo de caña modificado a 5°C), y t18 (turba a 20°C).

4.4.1 Peso de Hojas Funcionales

Realizado el análisis de la variancia con los registros de hojas funcionales de plantas de *Lactuca sativa* cultivadas con inoculaciones periódicas de *Azotobacter spp*, mantenido o conservado con diferentes métodos, se presentó diferencias altamente significativas para tratamientos, sustratos, inoculantes, adicional y factorial vs adicional. Cuadro 30.

Se destaca el soporte s3 (turba mantenida a 20°C) que estadísticamente se impone a s1 (jugo de caña modificado enriquecido mantenido a 5 °C), y s2 (tierra mantenida a 5°C). Cuadro 30. En cuanto a las inoculaciones de los adicionales se destacan del testigo absoluto (sin inoculación), y la

cepa de la bacteria aislada y purificada se impone a las cepas liofilizada y conservada en agua por 90 días.

Los Microorganismos como promotores de crecimiento vegetal tienen la capacidad de sintetizar diferentes reguladores de crecimiento vegetal como auxinas, giberelinas y citoquininas; sintetizan sustancias como tiamina, ácido nicotínico, ácido pantoténico, rivoflanina y otras hormonas vegetales capaces de estimular la germinación. Estos metabolitos secundarios liberados al medio contribuyen en forma directa a que las plantas desarrollen más sus tejidos radiculares y liberen exudados ricos en carbohidratos que benefician el crecimiento y adaptación del microorganismo en la rizósfera (Dobbelaere *et al*, 2003). (Pandey *et al*, 1990).

Este desarrollo se refleja cuando en aislados obtenidos a partir de la rizósfera se ha identificado algunos géneros entre ellos *Azotobacter*, que producen cantidades más altas de IAA que suelos aislados no asociados con las raíces (Asghar *et al*, 2002).

Para, Frioni (1999), el mecanismo de acción directo de *Azospirillum spp*, *Azotobacter spp*. y *Bacillus* por excelencia es la producción de fitohormonas, ejerciendo un efecto estimulador de crecimiento marcado cuando las plantas están en estado de plántula.

Cuadro 30.- Análisis de la varianza para el peso de hojas funcionales de *Lactuca sativa*, var green salad bowl cultivadas con inoculaciones de *Azotobacter spp*, mantenido bajo diferentes grados de conservación. Tumbaco-Pichincha, 2013.

FdeV	GL	CM	
TOTAL	129		
TRATAMIENTO	12	6401.44	**
SUSTRATO	2	16400.70	**
s3vss2s1	1	30037.19	**
INOCULANTES	2	4303.96	**
i0vsi1i2	1	8503.83	**
SXI	4	1519.04	ns
ADICIONAL	3	8150.58	**
a0vsa1a2a3	1	11645.06	**
a3vsa1a2	1	12407.06	**
a3vsa2	1	11333.56	**
FAC x ADI	1	4880.01	**
ERROR EXP	117	644.02	
Promedio (g)		90.37	
CV (%)		28.08	
Elaborado por: David Castro			
Año: 2013.			

Según la prueba de significación estadística realizada, Cuadro 31, se conformaron siete rangos de significación, ubicándose en el primero rango el tratamiento t13, (Cepa de *Azotobacter*, aislada y purificada) la cual no se sometió a ningún método de preservación o conservación, por lo qué, según mencionan autores como Pettersson (2004), Catroux, et ál, (2001), Kloepper, et al, (1989) reportan que la técnica de preservación donde se desarrolla actividad biológica hace que se pierda la estabilidad genética, puesto que al estar las células creciendo hay una alternancia de generaciones, y al cabo del tiempo las células que se están guardando serán descendientes lejanas de las células iniciales y es posible que ya no conserven algunas de sus características.

La diferencia entre la cepa aislada y purificada t13 (a3) frente al testigo t 10 (a0) es de 1.97 veces, esto confirma de alguna manera que la utilización de *Azotobacter* en el cultivo tuvo un efecto positivo en el desarrollo de las plantas, es decir se confirma el beneficio de su utilización según lo reportado por Vélez (2010), Caicedo (2010), Chalco (2011) y Vásquez (2011).

Se registró también que ocho de los doce tratamientos evaluados favorecieron en el peso de las hojas funcionales, en tanto que solo el tratamiento uno (Jugo de caña modificado enriquecido inoculado y mantenido por 90 días a 5°C, inoculada en la siembra) resultó ubicarse un rango menor al del testigo absoluto. Cuadro 31.

Cuadro 31.- Promedio y rangos de significación del peso de hojas funcionales de *Lactuca sativa*, var. green salad bowl cultivadas con soportes tratados con *Azotobacter spp.* Tumbaco-Pichincha, 2013.

Trat	Codificación	Descripción	Peso hojas funcionales (g)	Rangos de significación
t13	a3	Cepa de <i>Azotobacter spp.</i> aislada y purificada	138.17	a
t9	s3i2	Turba inoculada y mantenida por 90 días a 20°C, inocuada en la siembra, 3 y 15 días después del transplante.	130.70	ab
t8	s3i1	Turba inoculada y mantenida por 90 días a 20°C, inocuada en la siembra y 3 días después del transplante.	122.03	abc
t11	a1	Agua inoculada con <i>Azotobacter spp.</i>	99.50	bcd
t12	a2	Liofilizado de <i>Azotobacter spp.</i>	90.56	bcd
t5	s2i1	Tierra inoculada y mantenida por 90 días a 5°C, inoculada en la siembra y 3 días después del transplante	86.06	cd
t7	s3i0	Turba inoculada y mantenida por 90 días a 20°C, inocuada en la siembra.	83.62	cd
t6	s2i2	Tierra inoculada y mantenida por 90 días a 5°C, inoculada en la siembra, 3 y 15 días después del transplante	77.65	cd
t4	s2i0	Tierra inoculada y mantenida por 90 días a 5°C, inoculada en la siembra.	76.745	d
t3	s1i2	Jugo de caña modificado enriquecido inoculado y mantenido por 90 días a 5°C, inoculada en la siembra, 3 y 15 días después del transplante	75.07	d
t10	a0	Testigo absoluto (sin cepa)	70.00	d
t2	s1i1	Jugo de caña modificado enriquecido inoculado y mantenido por 90 días a 5°C, inoculada en la siembra, 3 días después del transplante	67.42	d
t1	s1i0	Jugo de caña modificado enriquecido inoculado y mantenido por 90 días a 5°C, inoculada en la siembra.	57.24	e

En la prueba de significación de Tukey al 5% para la interacción entre inoculantes de *Azotobacter spp*, y épocas de inoculación tenemos, se presenta tres rangos de significación estadística en donde el tratamiento t9 (s3i2) (soporte 3 inoculado a la siembra, transplante y 15 días después) se encuentra en el primer rango de significación con un promedio del peso de 130.70 g, en tanto que al final del tercer rango se muestra el tratamiento t1 (s1i0) (soporte uno inoculado a la siembra) con un peso promedio de hojas funcionales de 57.24 g . Cuadro 32.

Cuadro 32.- Tukey al 5 % para interacción entre inoculantes y épocas de inoculación de *Azotobacter spp*, en plantas de *Lactuca sativa* del registro de peso de hojas funcionales. Tumbaco-Pichincha, 2013.

Trat.	Cod.	Descripción	Peso hojas funcionales (g)	Rangos de significación
t9	s3i2	Turba inoculada y mantenida por 90 días a 20°C, inoculada en la siembra, 3 y 15 días después del transplante.	130.70	a
t8	s3i1	Turba inoculada y mantenida por 90 días a 20°C, inoculada en la siembra y 3 días después del transplante	122.03	b
t5	s2i1	Tierra inoculada y mantenida por 90 días a 5°C, inoculada en la siembra y 3 días después del transplante	86.06	b c
t7	s3i0	Turba inoculada y mantenida por 90 días a 20°C, inoculada en la siembra.	83.62	c
t6	s2i2	Tierra inoculada y mantenida por 90 días a 5°C, inoculada en la siembra, 3 y 15 días después del transplante	77.65	c
t4	s2i0	Tierra inoculada y mantenida por 90 días a 5°C, inoculada en la siembra.	76.75	c
t3	s1i2	Jugo de caña modificado enriquecido inoculado y mantenido por 90 días a 5°C, inoculada en la siembra, 3 y 15 días después del transplante.	75.07	c
t2	s1i1	Jugo de caña modificado enriquecido inoculado y mantenido por 90 días a 5°C, inoculada en la siembra, 3 días después del transplante	67.42	c
t1	s1i0	Jugo de caña modificado enriquecido inoculado y mantenido por 90 días a 5°C, inoculada en la siembra.	57.24	c

Elaborado por: David Castro
Año: 2013.

Realizada la prueba de separación al 5% de Tukey, para inoculantes bacterianos de *Azotobacter spp*, en registro de peso de hojas funcionales de plantas de *Lactuca sativa*, se ubica al inoculante s3 (turba mantenida a 20°C) en el primer rango de significación que se destaca de los inoculantes s2 (tierra mantenida a 5°C) y s1 (Jugo de Caña Modificado enriquecido mantenido a 5 °C) que se ubican en el segundo y último rango. Cuadro33.

Cuadro 33.- Tukey al 5 % para interacción entre inoculantes y épocas de inoculación de *Azotobacter spp*, en plantas de *Lactuca sativa* del registro de peso de hojas funcionales. Tumbaco-Pichincha, 2013.

Inoculante	Descripción	Peso hojas funcionales (g)	Rangos de significación
s3	Turba inoculada y mantenida por 90 días a 20°C	112.12	a
s2	Tierra inoculada y mantenida por 90 días a 5°C	80.15	b
s1	Jugo de caña modificado enriquecido inoculado y mantenido por 90 días a 5°C	66.58	b
Elaborado por: David Castro			
Año: 2013.			

Las épocas de inoculación practicadas en la presente investigación según la prueba de Tukey al 5% se presentan en un mismo rango, Cuadro 34.

Además de las características propias del soporte las inoculaciones realizadas después de la siembra fueron favorables ya que se menciona que si el inóculo es aplicado a la semilla, las poblaciones bacterianas se desarrollan más en la porción superior del sistema radical, sin colonizar abundantemente las porciones media y baja Hatzinger y Alexander,(1994), citado por Loredó-Ostí, *et al*, (2004), y esto se traduce en algunos casos en manifestar de mejor manera la promoción de crecimiento de las rizobacterias.

Cuadro 34.- Tukey al 5 % para interacción entre inoculantes y épocas de inoculación de *Azotobacter spp*, en plantas de *Lactuca sativa* del registro de peso de hojas funcionales. Tumbaco-Pichincha, 2013.

Inoculante	Descripción	Peso hojas funcionales (g)	Rangos de significación
i2	En la siembra, 3 y 15 días después del transplante	94.47	a
i1	En la siembra y 3 días después del transplante	91.84	a
i0	Inoculación a la siembra	72.54	a
Elaborado por: David Castro			
Año: 2013.			

5 CONCLUSIONES

- 5.1 Se lograron identificar en laboratorio tres soportes promisorios para dar albergue a *Azotobacter spp*, durante 90 días; soporte a base de turba mantenida en 20 °C; soporte de jugo de caña modificado y enriquecido (NaCl 0.17 gL⁻¹, NH₄(SO₄) 0.10 gL⁻¹, MgSO₄ 0.0082 gL⁻¹, Extracto de lavadura 3.5 gL⁻¹, agua peptona 5.00 gL⁻¹, CaCO₃ 0.05 gL⁻¹) mantenido en 5 °C y soporte a base de tierra o suelo mantenido a 5°C.
- 5.2 Los tratamientos que favorecieron el desarrollo vegetativo, en plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L), son s3i2 (turba mantenida a 20°C por 90 días con inoculaciones; en la siembra 3 y 15 días después del transplante), s3i1 (turba mantenida a 20°C por 90 días con inoculaciones en la siembra y 3 días después del transplante), s2i1 (tierra mantenida a 5°C por 90 días con inoculaciones en la siembra y 3 días después del transplante).

6 RECOMENDACIONES

- 6.1 Utilizar como soporte para dar albergue a la bacteria *Azotobacter spp*, la formulación a base de turba a una temperatura de 20 °C; alternatively, se puede utilizar también las formulaciones a base de jugo de caña modificado y enriquecido (NaCl 0.17 gL⁻¹, NH₄(SO₄) 0.10 gL⁻¹, MgSO₄ 0.0082 gL⁻¹, Extracto de lavadura 3.5 gL⁻¹, agua peptona 5.00 gL⁻¹, CaCO₃ 0.05 gL⁻¹), y formulaciones en base a tierra o suelo.
- 6.2 Para contribuir en el desarrollo vegetativo de lechuga *Lactuca sativa* L, Variedad green salad bowl se puede utilizar turba inoculada con *Azotobacter spp* y mantenida a 20°C por 90 días con inoculaciones; en la siembra, 3 y 15 días después del transplante, o inoculaciones en la siembra y 3 días después del transplante y tierra inoculada con *Azotobacter spp* y mantenida a 5°C por 90 días con inoculaciones en la siembra y 3 días después del transplante.
- 6.3 Para futuras investigaciones se sugiere.
- Realizar un estudio más profundo a nivel molecular para tener una identificación exacta de la cepa evaluada.
 - Realizar pruebas específicas cuantitativas de los promotores de crecimiento generados por la cepa en estudio.
 - Analizar la composición organomineral de cada formulación
 - Ensayar con las mismas formulaciones evaluando tipos de envases, porcentaje de humedad y concentración de oxígeno.
 - Evaluar el efecto de los soportes en condiciones de campo.
 - Estimar los costos de producción de una planta de procesamiento del biofertilizante a base de *Azotobacter spp* en la Facultad de Ciencias Agrícolas.

7 RESUMEN.

En el presente trabajo se evaluó la sobrevivencia de una cepa de *Azotobacter spp* inoculada en seis formulaciones diferentes de soportes durante un periodo de incubación de 90 días, en tres diferentes temperaturas, en condiciones controladas de laboratorio. Posteriormente se realizó un ensayo con *Azotobacter spp* proveniente de diferentes estados de conservación, en condiciones de invernadero para validar el comportamiento de *Azotobacter spp*, como promotor de crecimiento en el cultivo de lechuga. La investigación se condujo en el laboratorio e invernadero de Microbiología y Fitopatología General ubicados en el Campo Docente Experimental La Tola CADET, de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Central del Ecuador. Las fuente de inculo se aislaron de las parcelas de horticultura del CADET.

Para determinar la sobrevivencia de la bacteria en laboratorio se realizó conteos periódicos de la población, además de observaciones de su desarrollo in vitro. Para la evaluación del efecto de los biofertilizantes en el cultivo de lechuga se evaluó el peso de hojas funcionales.

De las primeras 37 formulaciones evaluadas se preseleccionaron seis, “Se4” (Suero, jugo de caña modificado en relación 2:1), “Ti” (Tierra esterilizada), “JCMe” (Jugo de caña en solución mineral con levadura seca diluida en relación 6:3), “Se8” (Suero, levadura y jugo de caña modificado en relación 4:1:2), “AH” (Residuo industria cervecera denominado "Afrecho húmedo" puro sin tratar), “T” (Turba esterilizada), que lograron poblaciones que fluctuaron desde 1.56×10^{10} UFC x ml⁻¹, hasta 6.56×10^9 UFC x ml⁻¹, las mismas que superaron a la población aproximada 10×10^6 UFC x ml⁻¹ y 30×10^6 UFC x ml⁻¹ reportadas en un estudio inicial como adecuadas.

Se identificó que de las 6 formulaciones evaluadas hasta los 90 días se destacaron las siguientes t3 “Ti”+ 5°C (tierra esterilizada mantenido a 5°C), t4 “JCMe” + 5°C (Jugo de caña en solución mineral con levadura seca diluida en relación 6:3 mantenido a 5°C), y t18 “T” (turba esterilizada mantenida a 20°C), con relaciones de crecimiento que van desde 2.29×10^{10} UFC x ml⁻¹ hasta los 9.53×10^9 UFC x ml⁻¹.

En la fase de invernadero la cepa aislada y purificada favoreció de mejor manera el desarrollo del cultivo, que las demás cepas mantenidas en incubación, pero aún la mayoría se destaco del testigo absoluto.

Se seleccionó como biofertilizantes promisorios a t9 s3i2 (turba mantenida a 20°C por 90 días con inoculaciones; en la siembra 3 y 15 días después del trasplante), t8 s3i1 (turba mantenida a 20°C por 90 días con inoculaciones en la siembra y 3 días después del trasplante), t5 s2i1 (tierra mantenida a 5°C por 90 días con inoculaciones en la siembra y 3 días después del trasplante), que dieron un peso de hojas funcionales de 130.70 g hasta 86.06 g.

8 SUMMARY

In this study the survival of a strain of *Azotobacter* spp inoculated into six different media formulations during an incubation period of 90 days, at three different temperatures in controlled laboratory conditions was evaluated. Subsequently a trial *Azotobacter* spp from different states of preservation, under greenhouse conditions to validate the behavior of *Azotobacter* spp, as growth promoter in the lettuce crop was made. The research was conducted in the laboratory and greenhouse of Microbiology and Plant Pathology General located in Campo Experimental La Tola CADET Teaching, Faculty of Agricultural Sciences of the Central University of Ecuador. The inoculum source were isolated plots CADET horticulture.

To determine the survival of the bacteria in laboratory periodic population counts were carried out and observations in vitro development. To evaluate the effect of bio-fertilizers in the cultivation of lettuce weight of functional leaves was evaluated.

Within the first 37 formulations evaluated were shortlisted six "Se4" (Suero, cane juice amended 2:1), "Ti" (Soil sterilized), "JCMe" (cane juice mineral solution diluted with dry yeast ratio 6:3), "Se8" (whey, yeast and cane juice modified 4:1:2 ratio), "AH" (brewing residue called "wet bran" pure untreated), "T" (sterilized peat), who managed populations ranged from 1.56×10^{10} CFU x ml⁻¹ to 6.56×10^9 CFU x ml⁻¹, the same as the approximate population exceeded 10×10^6 CFU x ml⁻¹ x 30×10^6 CFU ml⁻¹, reported in an early study as appropriate.

It was found that the 6 formulations evaluated until 90 days following t3 "Ti" is highlighted +5 ° C (sterilized soil kept at 5 ° C), t4 "JCMe" +5 ° C (cane juice mineral solution dry yeast diluted in 6:3 ratio maintained at 5 ° C), and t18 "T" (sterile peat maintained at 20 ° C), with ratios ranging from 2.29 growth x 10^{10} CFU x ml⁻¹ to 9.53×10^9 the CFU x ml⁻¹

In phase greenhouse isolated and purified strain better favored crop development, as other strains maintained in incubation, but still stood out the most absolute control.

Were selected as promising biofertilizers t9 s3i2 (peat maintained at 20 ° C for 90 days with inoculations, in planting 3 and 15 days after transplanting), t8 s3i1 (peat maintained at 20 ° C for 90 days with inoculations at planting and 3 days after transplantation), t5 s2i1 (land kept at 5 ° C for 90 days with inoculations at planting and 3 days after transplantation), giving a weight of functional leaves 86.06 g to 130.70 g.

9 BIBLIOGRAFÍA

- ABELA, E.; VALENZUELA, R. 2006. Situación de los cultivos leguminosos y los biofertilizantes en Bolivia. In “Taller sobre inoculantes – Estado actual y perspectivas”, realizado en el marco de la Red Iberoamericana de Fertilizantes Microbianos para la Agricultura. (Montevideo-Uruguay 27 al 30 de sep de 2006). Memorias. Montevideo, UR. Departamento de Microbiología de Suelos. 101 p
- ACUÑA, O.; CASTRO, B.; BADILLA, W.; BORNEMISZA, E. 1996. Producción y uso de inoculantes para leguminosas. ¿Puede la agricultura sostenible ser competitiva?. In Congreso Nacional Agronómico y de Recursos Naturales 10 (San José-Costa Rica 8-12 Jul 1996) Memorias. San José, CR. ACCS. s.p.
- ASGHAR, N.; ZAHIR, A.; ARSHAD, M.; KHALIQ, A. 2002. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in Brassica jucea. Biol Fert Soils. N ° 35:231–237
- AGUIRRE, J.; IRIZAR, M.; DURÁN, A. GRAJEDA O.; PEÑA, M.; LOREDO, C.; GUTIÉRREZ, A. 2009. Los Biofertilizantes Microbianos: Alternativa Para La Agricultura En México. Chiapas, MX. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. 86 p.
- ALFONSO, E.; LEYVA, A.; HERNANDEZ, A. 2005. Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para cultivos de tomate (*Lycopersicum esculentum*, Mill). Revista Colombiana de Biotecnología. 2(2):47-54
- ALONSO, J. ; STEPANOVA, A. 2004. The ethylene signaling pathway. Science. 306: 1513-1515
- ALVARES, L.; AYOUBI, H.; REYES, I.; VALERY, A. 2008. Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. Bioagro. 20(1): 37-48
- ÁLVAREZ, J.; CONSTANTINO, M.; ESPÍN, E.; GÓMEZ, R.; PAT, J. 2011. Efecto de la inoculación de *Azotobacter chroococcum* y *Glomus intraradices* en el crecimiento y nutrición de plántulas de papaya en fase de vivero. Agronomía Costarricense. 35(1): 15-31
- ANAYA, M.; FIGUEROA, M.; RUIZ, M. 2005. Optimización de la producción de la cepa *Azotobacter* sp. Pachaz 008. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, Consultado 19 Mar 2013 disponible en: http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/veracruz01/TRABAJOS/AREA_II/CII-68.pdf
- ANGLES, J. 1977. Cultivo de la lechuga. Guía práctica. Lérida, ES. Larrosa. 43 p.
- BALSER, C.; WIXON, L. 2009. Investigating biological control over soil carbon temperature sensitivity. Global Change Biology. 15(12): 2935-2949
- BASHAN, Y.; LEVANONY, H. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. Can J Microbiol 36:591–608
- BASHAN, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. Biotechnology Advances. 16(4): 729-770

- BASHAN, Y. 1986. Migration of the rhizosphere bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* towards wheat roots in the soil. J. Gen. Microbiol. 132: 3407-3414
- BENDING, D.; TURNER, K.; JONES, E. 2002. Interactions between crop residue and soil organic matter quality and the functional diversity of soil microbial communities. Soil Biol Biochem 34: 1073–1082
- BENEDUZI, A.; PASSAGLIA, L. 2011. Bacteria in Agrobiology: Plant Growth Responses. Nueva York, US. Springer. 400 p.
- BERGEY. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8 ed. Baltimore, US. Waverly Press. p. 217 – 265
- BERNAL, G.; SUAREZ, A.; CAMPANA, D.; JEREZ, M.; SALVADOR, C.; GRAHAM, P.; AGUILAR, M. 2004. Interaccion rhizobio-turba. Quito, EC. INIAP. s. p.
- BERTSCH F. 2003. Absorción de nutrimentos por los cultivos. San José, CR. ACCS. 10: 62-105.
- BORDELEAU, M.; PREVOST, D. 1981. Quality of commercial legume inoculants in Canada. In Proceeding of the 8th North American *Rhizobium* Conference, University of Manitoba, Winnipeg, Canada.K..W. Clark and J.H.G. p. 562-565
- BROCK, T.; SMITH, D.; MADIGAN, M. 2001. Microbiología. 8 ed. Nueva York, US. Prentice- Hall. p. 330-907
- BROWN, M. 1974. Seed and root bacterization. Revision annual Phytopathology. 12:181–197
- BROWSE, J.; HOWE, G. 2008. New weapons and a rapid response against insect attack. Plant Physiology. 146: 832-838
- BROWSE, J. 2009. Jasmonate Passes Muster: A Receptor and Targets for the Defense Hormone. Annual Review of Plant Biology. 60:183-205
- CABALLERO, J.; MARTÍNEZ R. 1999. Soil fertilization limits the genetic diversity of *Rhizobium* in bean nodules. Symbiosis. 26: 111 – 121
- CABRERA; A.; MEDINA, N.; PULIDO, E. 2003. La biofertilización con rizobacterias y hongos micorrízicos arbusculares en la producción de posturas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y cebolla (*Allium cepa* L.) y crecimiento vegetativo. Cultivos Tropicales 24(1):15-24
- CAAN. 2007. *Azotobacter*, Consultado, 05 de Jul del 2013 disponible en: <http://www.microbiologybytes.com/video/Azotobacter.html>.
- CASSERES, E. 1971. Producción de hortalizas. 2 ed. México DF., MX. Herrera. p. 170-180
- CATROUX, G.; HARTMANN, A.; REVELLIN, C. 2001. Trends in rhizobial inoculant production and use. Plant and soil. 230(1) p. 21-30

CATTELAN, J.; FUHMANN, J.; HARTEL, G. 1990. Screening for Plant Growth-Promoting Rhizobacteria to Promote Early Soybean Growth Soil Sci. Soc. Am. J. 63: 1670-1680

CEPEDA, M. 2008. Prueba a nivel de invernadero y determinación de la sobrevivencia de un biofertilizante producido a partir de bacterias solubilizadoras de fósforo utilizando un medio de cultivo alternativo. Sangolqui, EC. Escuela Politécnica Del Ejército, Departamento De Ciencias de la Vida. p. 142

CHEN, J. 2006. The combined use of chemical and organic fertilizers and/or biofertilizer for crop growth and soil fertility. In International Workshop on Sustained Management of the soil-rhizosphere system for efficient crop production and fertilizer use 16: 20

CORVALÁN, D.; DUBOIS, M.; MEDANA, M.; PERTICARI, A.; RACCA, R.; RUIZ, A. 2006. Situación actual y perspectivas del mercado de semillas y biofertilizantes en la Argentina. In “Taller sobre inoculantes – estado actual y perspectivas”, realizado en el marco de la Red Iberoamericana de Fertilizantes Microbianos para la Agricultura. (Montevideo-Uruguay 27 al 30 de sep de 2006). Memorias. Montevideo, UR. Departamento de Microbiología de Suelos. 101 p

CRUM, A. 2004. Azotobacter, soil microbiology, Consultado 19 Mar 2013 disponible en: http://filebox.vt.edu/users/chagedor/biol_4684/Microbes/AZOTO.html

CUSSIANOVICH, P. 2001. Una aproximación a la agricultura orgánica. 17: 3-7

CUTLER, S.; RODRIGUEZ, P.; FINKELSTEIN, R.; ABRAMS, S. 2010. Absciscic Acid: Emergence of a core signaling network. Annual Review of Plant Biology 61: 651-679

DAYANA S. 2007. “Microbiología aplicada a las ciencias ambientales: “Reactores biológicos para el tratamiento de efluentes industriales” Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales, Montevideo., UY. Facultad de Ciencias Química, Universidad de la República. p. 189

DAZA, A.; SANTAMARIA, C.; RODRIGUEZ N.; CAMACHO, M.; ORIVE, R.; TEMPRANO, F. 2000. Perlite as a carrier for bacterial inoculants. Soil Biology and Biochemistry. 32(4): 567-572

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. 2003. Plant Growth - Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere. Critical Reviews in Plant Sciences (22): 107-149

ELMERICH, C. 1984. Molecular biology and ecology of diazotrophs associated with non-leguminous plants. Biotechnology. 2:967-978

ESCAFF, M. 2001. Hortalizas: Agenda del salitre. 11 ed. Santiago, CH. SOQUIMICH. p. 717-751

ESPIN, G. 2004. Biología de *Azotobacter vinelandii*. México DF., MX. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. p. 58

ESQUIVEL, G.; VELÁZQUEZ, V.; ROJAS, L.; CERRATO, R.; CALVA, G.; FERNÁNDEZ, L.; RODRÍGUEZ, R. 2001. Efecto del queroseno en el enquistamiento de *Azotobacter nigricans*. México DF., MX. Instituto Mexicano del Petróleo. p. 1-2

FINKELSTEIN, R.; REEVES, W.; ARIIZUMI, T.; STEBER, C. 2008. Molecular aspects of seed dormancy. *Annual Review of Plant Biology*. 59: 387-415

FRIONI, L. 1999. Procesos Microbianos. Editorial de la Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto. *Argentina*. p. 332.

FUJII I.; HIGOSHITANI, A.; NISHIMURA, Y.; IYAMA, S.; HIROTA, Y.; YONEYAMA, T.; DIXON, R. 1987. Effect of inoculation with *Klebsiella oxytoca* and *Enterobacter cloacae* on dinitrogen fixation by rice-bacteria association. *Plant and Soil*. 103: 221-226

FUJIOKA, S.; YOKOTA, T. 2003. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annual Review of Plant Biology*. 54: 137-164

GANDHI, A.; SIVAKUMAR, K. 2010. Impact of vermicompost carrier based bioinoculants on the growth, yield and quality of rice (*Oryza sativa* L.) CV NLR 145. *The Ecoscan*, 4(1):83-88

GARASSINI, L. 1967. Microbiología Agraria. Maracay, VE. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía. p. 413-427

GIACONI, M. 1990. Cultivo de hortalizas. 7ed. Santiago de Chile. CH. Universitaria. p. 308

GILI S, P.; MARANDO, I.; SAGARDOY, R.; 1999. Survival of *Rhizobium meliloti* strains in alfalfa seeds and in soil isolates from the Upper Rio Negro valley and Neuquen. Buenos Aires, AR. *casa eitora Agricultura Tecnica* N° 59 paginas

GONZÁLES, J.; LÓPEZ, J. 1986. Production of auxinas, gibberellins and cytokinins by *Azotobacter vinelandii*. ATCC12837, in chemically defined media and dialyzed soil media. *Soil Biol. Biochem*. 18:119-120

GREGORY, P.; BOOTE, K.; SINCLAIR, M.; PAULSEN, G. 1994. Root growth and activity. Physiological and determination of crop yield. *Madison Wisconsin, US. American Society of Agronomy .Madison WI. USA.. 65 – 93*

HOLGUÍN, G. 2008. La comunicación entre bacterias y plantas. *Revista de la Academia Mexicana de Ciencias*. Volumen 59. Número 2. Consultado, 03 ene 2014, Disponible en: <http://www.bashanfoundation.org/gmaweb/pdfs/cellularcommunicationgina.pdf>.

HOWE, G.; JANDER, G. 2008. Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology* 59: 41–66

HUILCAPI, J. 2007. Aislamiento e identificación de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de muestras de suelo y raíz, de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha. Sangolquí-EC. Escuela Politécnica del Ejército, Departamento de Ciencias de la Vida. p. 66

JARAMILLO, J. 1990. Preparación y manejo de semilleros en hortalizas. *Manual de asistencia técnica*. p. 25-37

JIMÉNEZ, D. 2007. Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de *Azotobacter spp*, mediante el análisis de restricción del ADN ribosomal 16 s. Bogotá, CO. Pontificia Universidad Javeriana. p. 105

KAMIYA, Y. 2010. Plant Hormones: Versatile Regulators of Plant Growth and Development. Annual Review of Plant Biology (Edición especial):61

KENDE, H.; ZEEVAART, J. 1997. The Five "Classical" plant hormones. The plant cell. 9(1): 197

KENNEY, D. 1997. Comercialization of biological control products in the chemical pesticide world. in plant growth-promoting rhizobacteria-present status and future prospects, , Sapporo, JP. Faculty of Agriculture, Hokkaido University. p.127

KIM, T.; BOHMER, M.; HU, H.; NISHIMURA, N.; SCHROEDER, J. 2010. Guard Cell Signal Transduction Network: Advances in Understanding Absciscic Acid, CO₂, and Ca²⁺ Signaling. Annual Review of Plant Biology 61:561-591

KIM, TW.; WANG, Z. 2010. Brassinosteroid Signal Transduction from Receptor Kinases to Transcription Factors. Annual Review of Plant Biology 61:681-704

KLEE, H.; ESTELLE, M. 1991. Molecular genetic approaches to plant hormone biology. Annual Review of Plant Physiol 42:529 – 551

KLEINE-VEHN, J.; FRIML, J. 2008. Polar targeting and endocytic recycling in auxin-dependent plant development. Annual Review of Cell and Developmental Biology 24:447-473

KLOEPPER, J.; LIFSHITZ, R.; SCHROTH, N. 1988. *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. Anim Plant Sci 1:60–64

KLOEPPER, J.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. Trends Biotechnol 7:39–43

KLOEPPER, J. 1994. Plant grown promoting bacteria (other system), In *Azospirillum*. Boca Raton., CR. Plant Association. p. 137-154

LIN, L.; SADOFF, H. 1968. Encystment and polymer production of *Azotobacter vinelandii* in the presence of B-hidroxibutirato. J. Bacteriol. p. 2336-2343

LINDAHL, V.; BAKKEN.; R. 1995. Evaluation of methods for extraction of bacteria from soil. Microbiology Ecology. 16(2):135-142

LOREDO, C.; LÓPEZ, L.; ESPINOSA, D. 2004. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. Terra Latinoamericana 22:225-239

_____; BELTRÁN, L.; PEÑA DEL RÍO, A. 2007. Uso de biofertilizantes para la producción de maíz forrajero en condiciones de temporal. Buenos Aires, AR. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Folleto Científico N° 2 p. 60

_____; LÓPEZ, L.; ESPINOSA, D. 2004. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. Terra Latinoamericana. 22:225-239

LPSN List of prokaryotic names with standing in nomenclature. 2013. Consultado, 05 Jul del 2013 disponible en: <http://www.bacterio.net/classificationac.html#Azotobacter>

- MALLAR, A. 1978. La lechuga. Buenos Aires. AR. Hemisferio Sur. p. 27-55
- MCSTEEN, P.; ZHAO, Y. 2008. Plant Hormones and Signaling: Common Themes and New Developments. *Developmental Cell*. 14:467-473
- MIZUTANI, M.; OHTA, D. 2010. Diversification of P450 genes during land plant evolution. *Annual review of plant biology*. 61:291-315
- MONDINO, P. (2003) Control biológico de enfermedades de plantas. En *Producción Orgánica*. Capítulo 5.7. Montevideo-Uruguay p. 199-206. Consultado, 30 Nov 2013 disponible en: <http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/publica/Control%20Biologico%20enfermedades%20de%20plantas%20libro%20.pdf>
- MONTES, A. 1982. Manual enseñanza práctica de producción de hortalizas. San José, CR. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. p. 224
- MORADI, M.; SIADAT, S.; KHAVAZI, K.; NASERI, R.; MALEKI, A. 2011. Effect of application of biofertilizers and phosphorus fertilizers on qualitative and quantitative traits of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) Mirzaei a journal of crop ecophysiology. 5(18):51-66
- MORENO, N.; MORENO, L.; URIBE, D. 2006. Biofertilizantes para la agricultura en Colombia. In “Taller sobre inoculantes – estado actual y perspectivas”, realizado en el marco de la Red Iberoamericana de Fertilizantes Microbianos para la Agricultura. (Montevideo-Uruguay 27 al 30 de sep de 2006). Memorias. Montevideo, UR. Departamento de Microbiología de Suelos. 101 p.
- Naciones Unidas. 1992. Declaración de Río sobre el medio ambiente y el desarrollo. Conferencia de las Naciones Unidas sobre el medio ambiente y el desarrollo. Consultado 20 de Mar 2013 disponible en: http://www.bioculturaldiversity.net/Downloads/Papers/Rio_declaration_Spanish.pdf
- NAKAJIMA, M.; SHIMADA, A.; TAKASHI, Y.; KIM, Y.; PARK SHIN.; UEGUCHI-TANAKA, M.; SUZUKI, H.; KATOH, E.; IUCHI, S.; KOBAYASHI, M.; MAEDA, T.; MATSUOKA, M.; YAMAGUCHI, I. 2006. Identification and characterization of *Arabidopsis* gibberellin receptors. *Plant Journal*. 46:880-889
- NAMBARA, E.; MARION-POLL, A. 2005. Absciscic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology*. 56:165-185
- NGOMA, L.; BABALOLA, O.; AHMAD, F. 2012. Ecophysiology of plant growth promoting bacteria *Scientific Research and Essays* 7(47): 4003-4013, Consultado 03 Ene 2014 Disponible en: <http://www.academicjournals.org/SRE>
- NUNES, A. 2009. Biofortificação de plantas de alface (*Lactuca sativa* L.) geneticamente modificadas para aumento do teor de folato. Tesis Doctorado en Biología molecular. Brasília, BR. Universidad de Brasília. p. 134
- OKON, Y.; LABANDERA, C. 1994 Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol*. 26: 274-278
- ORVILLE, W.; NEUMANN, G.; SOCOLOFSKY, M. 1961 "Development and germination of the *Azotobacter* cyst." *The Journal of biophysical and biochemical cytology*. 10: 555-565

- PANDEY, A.; KUMAR, S. 1990. Inhibitory effects of *Azotobacter chroococcum* and *Azospirillum brasiliense* on range of rhizosphere fungi. *Indian Journal of Experimental Biology*. 28:52-54
- PAÑAFIEL, A. 2006. Estudio de la interacción entre inoculantes microbianos y residuos agroindustriales biotransformados para su uso en estrategias de revegetación y bioremediación. Granada., ES. Universidad de Granada. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. p. 272
- PETTERSSON, M. 2004. Factors Affecting Rates of Change in Soil Bacterial Communities. Loud, CH. Universidad Lound Suiza. p. 125
- PRESCOTT, H. 2002. Laboratory Exercises in Microbiology. 5 ed. New York, US. McGraw–Hill Companies. p. 237- 242
- PURVES, W.; SADOVA, D.; ORIAN, G.; HELLER, C. 2002. Vida, La Ciencia De La Vida. 6 ed. New York, US. Médica Panamericana. p. 1133
- RAJA, K.; KARMEGAM, N. 2010. Earthworm casts as an alternate carrier material for biofertilizers: Assessment of endurance and viability of *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus megaterium* and *Rhizobium leguminosarum*. *Scientia Horticulturae*. 124(2):286-289
- REVILLAS, J., RODELAS, B.; POZO, C.; MARTÍNEZ, M.; GONZÁLEZ, J. 2001. Production of B-group vitamins by two *Azotobacter* strains with phenolic compounds as sole carbon source under diazotrophic and adiazotrophic conditions. *Journal of Applied Microbiology*. 3(89):486–493
- ROJAS, G.; RAMÍREZ, H. 1993. Control hormonal del desarrollo de las plantas: fisiología, tecnología, experimentación. 2 ed. México DF. MX. Limusa. p. 263
- ROJAS, D.; ORTIZ, M.; RIVERA, D.; KLOEPPER, J.; BONILLA, R. 2013. Evaluation of three methods for preservation of *Azotobacter chroococcum* and *Azotobacter vinelandii*. *Univ. Sci*. 18(2):129-139
- ROLDÁN, G.; SOTO, C. 2005. Evaluación de sustratos para almácigos de hortalizas. *Agronomía Mesoamericana*. 16(2):171-183
- ROVIRA, A. 1973. Zones of exudation along plant roots and spatial distribution of micro-organisms in the rhizosphere. *Pestic. Sci*. 4:361-366
- RUIZ, T, SANTAMARIA, J.; LABANDERA, C.; ORIVE, R. 1979. Crecimiento y sobrevivencia de *Rhizobium japonicum* (CB-1809) y *Rhizobium trifolii* (WU-290) en turbas españolas de diferentes orígenes. In *Anales INIA/Serie Producción Vegetal*. 11:127-137
- RUPPEN, M.; GARMER, G. 1983. Protein turnover in *Azotobacter vinelandii* during encystment and germination. s.l. s.e. p. 1243-1248
- SAKAKIBARA, H. 2006. Cytokinins: Activity, Biosynthesis, and Translocation. *Annual Review of Plant Biology*. 57:431-449
- SALISBURY, F. 1994. Fisiología Vegetal. México DF., MX. Iberoamericana. p.759

- SANTILLANA, N. 2006. Producción de biofertilizantes utilizando *Pseudomonas* spp. Lima, PE. Departamento Académico de Biología, Universidad Nacional Agraria La Molina. p. 87-98
- SANTNER, A.; ESTELLE, M. 2009. Recent advances and emerging trends in plant hormone signaling. *Nature*. 459:1071-1078
- SANTOS, B.; LOBATO, A.; SILVA, R.; SCHIMIDT, D. 2009. Growth of lettuce (*Lactuca sativa* L.) in protected cultivation and open field. *Journal of Applied Sciences Research*. 5(5):529-533
- SARIBAY, G. 2003. Growth and nitrogen fixation dynamics of *Azotobacter chroococcum* nitrogen-free and own containing medium. Tesis Maestría en Ciencias Aplicadas. Turkia, Departamento de Ingeniería en alimentos. The middle East Technical University. p. 1-45
- SARIC, M.; KRSTIC, B. 1990. Specific responses of *Azotobacter* strains and sugar beet genotypes. En: *Nitrogen Fixation Developments in plant and soil sciences*. 48:333-335
- SCHWENKE, G.; HERRODGE, D.; MURRISON, R.; FELTON, W.; MARCELLOS, H. 1997. Management of crop residues and nitrogen fertility for improved dryland cereal production can benefit soil organic fertility. In: *Extending nitrogen fixation research to farmers fields. Procc of a International Workshop on managing legume nitrogen fixation in the cropping systems of Asia*. ICRISAT, Asia Center. India. p. 154 – 165
- SIDDIQUI, A. 2006. Root-associated bacteria inducing systemic resistance Book *Planta-Associated bacteria, Biocontrol and Biofertilización*. s. n. t. p. 111-142
- SMITH, R. 1992. Legume inoculant formulation and application. *Canadian Journal of Microbiology*. 38(6):485-492
- SMITH, R. 1995. Inoculant formulations and applications to meet changing needs. In *Nitrogen fixation: fundamentals and applications*, I. A. Tikhonovich, N.A. Provorov, V.I. Romanov and W.E. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands Newton. p. 653-657
- SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. 1994. Handbook for Rhizobia. *Methods in Legume-Rhizobium technology*. Springer-Verlag. p. 332-341
- SRIVASTAVA, L. 2002. Plant growth and development. *Hormones and environment*. London., UK. Academic Press Elsevier science. p.772
- SUQUILANDA, M. 2003. Producción orgánica de hortalizas en la sierra norte y central del Ecuador. *MAG*. p. 147-160
- TANG, W, PASTERNAK, J.; GLICK, B. 1994. Stimulation of canola root growth by *Pseudomonas putida* GR 12-2 and its genetically engineered derivatives. *Life Sci Adv* 13:89-95
- TANG, H.; YANG, H. 1997. Research and application of biocontrol of plant diseases and pgpr in china. in *plant growth-promoting rhizobacteria-present status and future prospects*. Sapor., JN. Faculty of Agriculture, Hokkaido University. p. 4-9
- TANIMOTO, E. 2005. Regulation of Root Growth by Plant Hormones- Roles for Auxin and gibberellin. *Critical Reviews In Plant Sciences* . (24):249-265

TCHAN, Y. 1984. Family II Azotobacteraceae Pribram 1933. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 1:219-220

The International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions. 2013. Consultado 19 Marzo 2013 20:00 horas, disponible en: <http://www.ismpminet.org/resources/common/names/lettuce.asp>

TIRSCONIA, J. 1993. Hortalizas de hoja. Buenos Aires, AR. Albatros. p. 7-25

TORTORA, G.; FUNKE, B.; CASE, C. 2007. Introducción a la Microbiología. Buenos Aires, AR. Médica Panamericana. 9:998

TREVORS, J.; VAN ELSAS, J.; LEE, H.; VAN, L. 1992. Use of alginate and other carriers for encapsulation of microbial cells for use in soil. Microbiology, Releases. 1:61-69

UEGUCHI-TANAKA, M.; NAKAJIMA, M.; MOTOYUKI, A.; MATSUOKA, M. 2007. Gibberellin receptor and its role in gibberellin signaling in plants. Annual Review of Plant Biology. 58:183-98

USDA. 1997. Importation of Lettuce (*Lactuca sativa* .L) from Colombia into the United States. Qualitative, Pathway-Initiated pest Risk Assessment. Consultado 20 Marzo 2013 disponible en: [https://web01.aphis.usda.gov/oxygen_fod/fb_md_ppq.nsf/d259f66c6afbd45e852568a90027bcad/e5951bf790fa0aac852568f6004dc06c/\\$FILE/0034.pdf](https://web01.aphis.usda.gov/oxygen_fod/fb_md_ppq.nsf/d259f66c6afbd45e852568a90027bcad/e5951bf790fa0aac852568f6004dc06c/$FILE/0034.pdf)

VÁSQUEZ, L. 2011. Influencia de *Pseudomonas spp*, *Rhizobium etli* y *Azotobacter spp* en tres épocas y a tres dosis para promover el desarrollo del cultivo de fréjol (*Phaseolus vulgaris* l var. INIAP 430-portilla). Tumbaco, EC. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas. p. 150

VELA, G. (1974) Survival of *Azotobacter* in Dry Soil. Department of Biological Sciences, North Texas State University, Denton. American Society for Microbiology. 28(1)77-79

VÉLEZ, H. 2010. "Evaluación de cepas de *Azotobacter spp*. en el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa*. var. Green Salad Bowl), Tumbaco, EC. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas. p. 106

VERT, G.; NEMHAUSER, J.; GELDNER, N.; HONG, F.; CHORY, J. 2005. Molecular Mechanisms of Steroid Hormone Signaling in Plants. Annual Review of Cell and Developmental Biology 21:177-201

VLOT, A.; DEMPSEY, D.; KLESSIG, D. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. Annual Review of Phytopathology. 47:177-206

WOOMER, L. 1994. Most probable number counts. In Methods of Soil Analysis: Part 2- Microbiological and Biochemical Properties. Madison., US. Soil Sci. Soc. Am. p. 59-79

YAMAGUCHI, S. 2008. Gibberellin metabolism and its regulation. Annual Review Plant Biology. 59:225-251

ZAZÍMALOVÁ, E.; KRECEK, P.; SKUPA, P.; HOYEROVÁ, K.; PETRÁSEK, J. 2007. Polar transport of the plant hormone auxin-the role of Pin-Formed (PIN) proteins. Cellular and Molecular Life Sciences . 64:1621-1637

ZHAO, Y. 2010. Auxin Biosynthesis and Its Role in Plant Development. *Annual Review of Plant Biology* 61: 49-64

10 Anexos

Anexo 1. Medio para el aislamiento de *Azotobacter spp.*

BACTERIA <i>Azotobacter spp</i>	DOSIS
Ashby <ul style="list-style-type: none">• K_2HPO_4• $MgSO_4 \times 7 H_2O$• NaCl• $CaSO_4 \times 2H_2O$• Manitol• Bacto Agar• $CaCO_3$• Agua	0.2 g/l 0.2 g/l 0.2 g/l 0.1 g/l 10 g/l 15 g/l 5.0 g/l 1000 ml

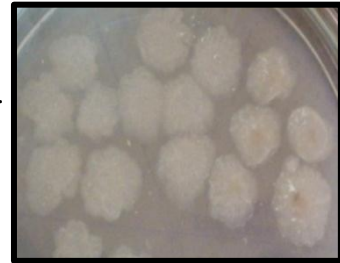
Anexo 2. Características de crecimiento de *Azotobacter spp*

MICROORGANISMO	MEDIO DE CULTIVO	INCUBACIÓN		CARACTERÍSTICA DE CRECIMIENTO
		TIEMPO (Días)	TEMPERATURA (°C)	
<i>Azotobacter spp.</i>	Ashby	4	28	Colonias de apariencia mucosa de color blanco, alrededor del grano de tierra, que con el tiempo se tornan marrón.

Anexo 3. Caracterización morfológica de colonia de *Azotobacter spp* utilizada en el ensayo

Características de la colonia

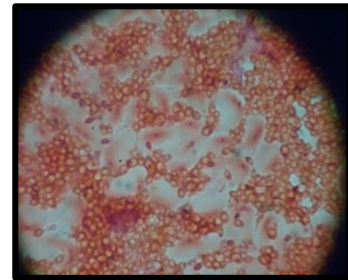
Diámetro: 3.0 – 4.0 mm
Color: blanquecino de aspecto translúcido en los primeros días de incubación y café oscuro conforme se desarrollaron.
Forma: irregular
Borde: liso
Superficie: cóncava
Consistencia: mucilaginosa
Tiempo de aparición: 3-5 días



Macrofotografía de *Azotobacter spp*

Características de la bacteria

Forma: ovoide a bacilar
Tinción Gram: Gram negativa



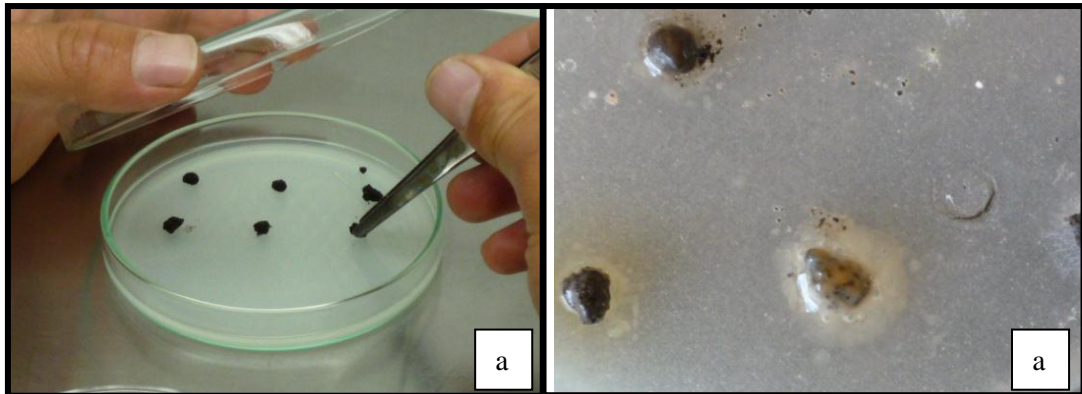
Microfotografía de *Azotobacter spp*

Anexo 4. Aislamiento primario y secundario de *Azotobacter spp*

Aislamiento primario de *Azotobacter spp* (Aquilanti *et al*, 2004), Siguiendo la técnica de siembra de gránulos de suelo, que consiste en:

Primario:

- (a) Colocar 20 gránulos de suelo rizosférico sobre el medio de cultivo “Ashby”, separados a 1 cm cada uno de ellos.
- (b) Someter a incubación a una temperatura de 30°C durante 3 a 4 días, hasta observar la presencia de colonias traslúcidas y mucilaginosas alrededor de cada gránulo de suelo.

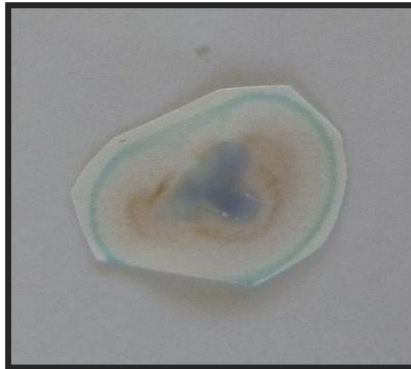


Secundario:

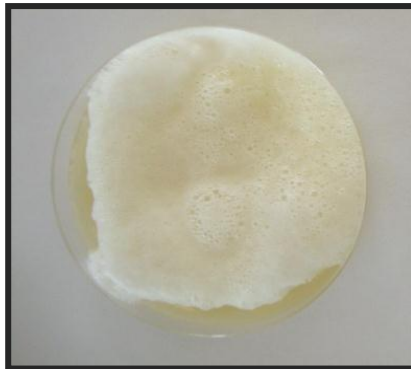
- (a) Con un asa de platino tomar una alícuota de las colonias traslúcidas y realizar un rayado en zigzag sobre el medio de cultivo Ashby
- (b) Someter a incubación a una temperatura de 30°C durante 3 a 4 días

Anexo 5. Pruebas bioquímicas realizadas a la bacteria en estudio. (*Azotobacter spp*)

1. Prueba de oxidasa



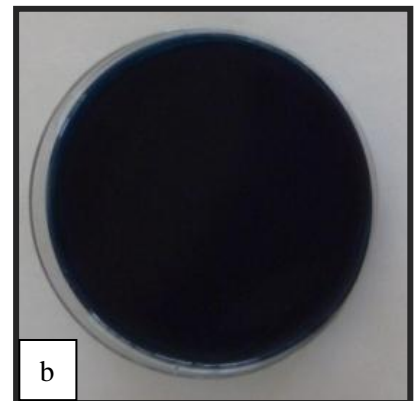
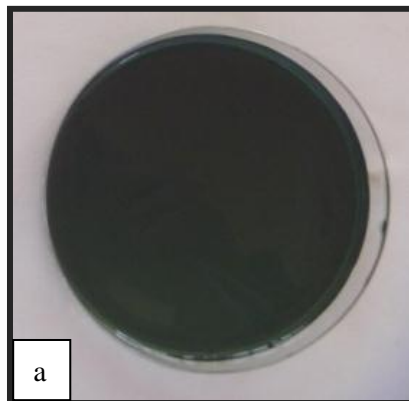
2. Prueba de la catalasa



3. Prueba del Citrato

a) Sin inocular

b) *Azotobacter spp*



Continuación Anexo 5.

4. Prueba del Indol

a) Sin inocular

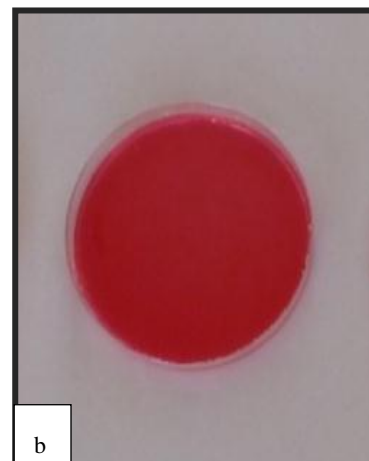
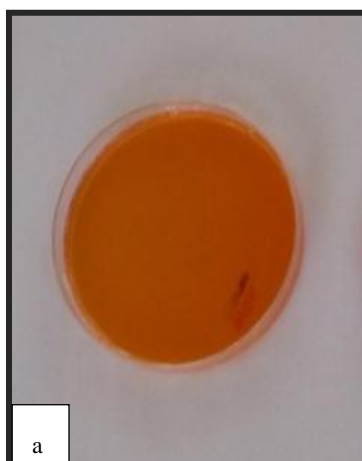
b) *Azotobacter spp*



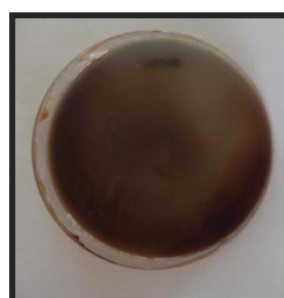
5. Agar úrea

a) Sin inocular

b) *Azotobacter spp*



6. Prueba de amilasa



Anexo 6. Formulaciones preseleccionadas para evaluar por 90 días en condiciones de temperatura controlada (Fase de Laboratorio).



Anexo 7. Ubicación de los tratamientos dentro del laboratorio. (Según temperatura)

Temperatura ambiente



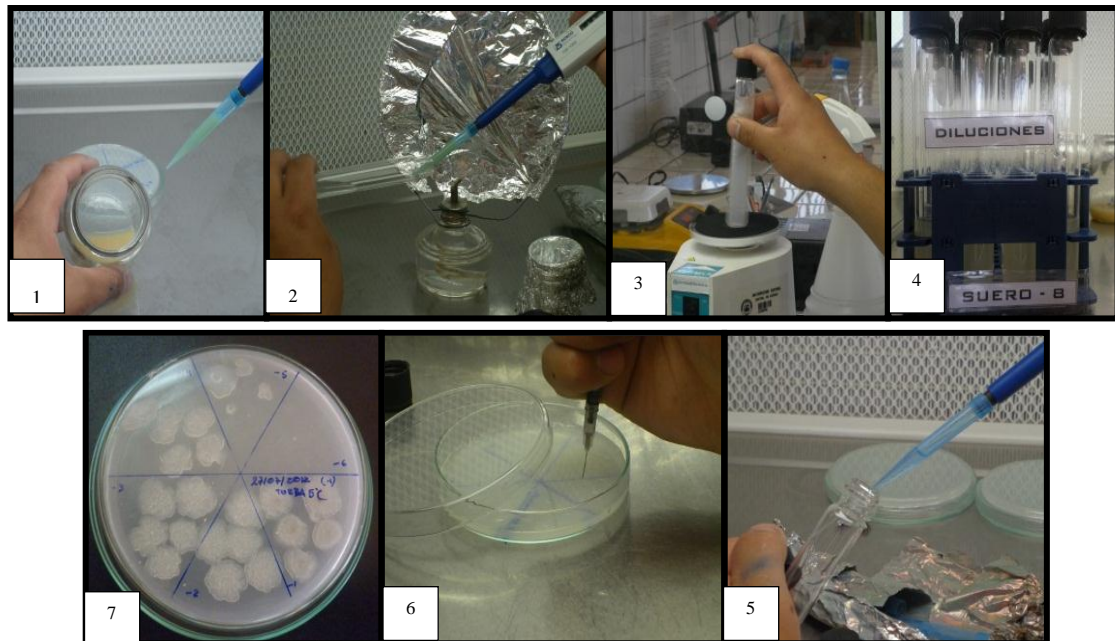
Temperatura de 5 °C



Temperatura de 20 °C

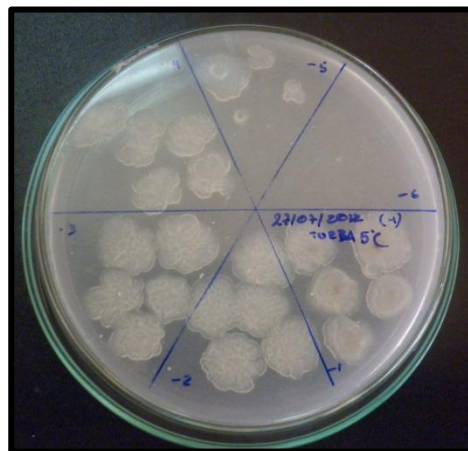
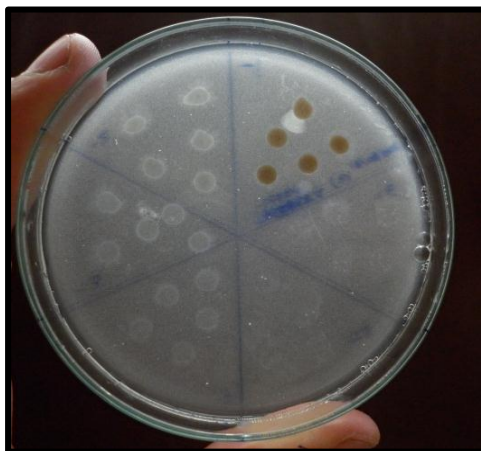


Anexo 8. Conteo bacteriano de los soportes por el método de Woomer 1994.

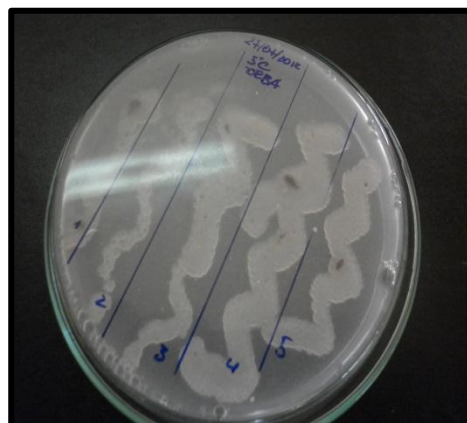


1. Tomar una alícuota de la solución madre de 1ml.
2. Colocar la muestra en un tubo de ensayo conteniendo 9 ml de agua destilada esterilizada
3. Agitar la solución por 4 a 5 minutos.
4. Dejar reposar por 4 a 5 minutos, y tomar una alícuota de 1 ml de esta solución.
5. Repetir el proceso hasta obtener diluciones seriadas de 1×10^{-6} .
6. Tomar de cada dilución con una micropipeta de 5 μ l 5 alícuotas e inocularlas en secciones dentro de la misma caja petri.
7. Incubar a de 30°C durante 3 a 4 días, hasta observar la presencia de colonias traslúcidas y mucilaginosas.
8. Realizar el conteo de positivos, obtener la matriz de crecimiento para obtener el estimado de población según tabla de Woomer 1994.
9. Realizar los cálculos respectivos para ajustar a la dilución utilizada.

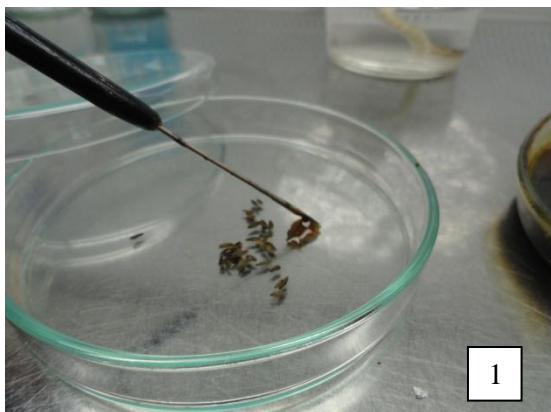
Anexo 9. Conteo de positivos y negativos por el método de Woormer 1994.



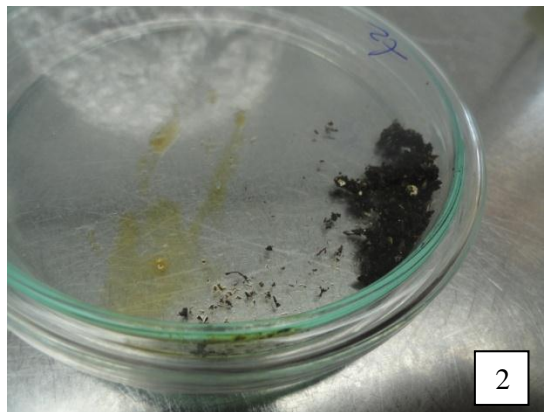
Anexo 10. Apreciación cualitativa del crecimiento bacteriano.



Anexo 11. Fotografías.



Fotografía 1.- Peletización de semilla bacteriana



Fotografía 2.- Inoculación

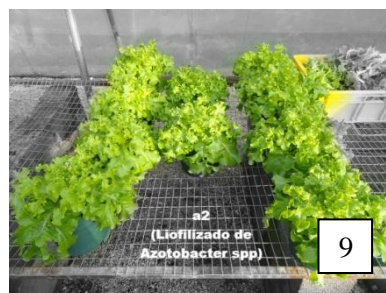


Fotografía 3 y 4.- Inoculación en plántulas

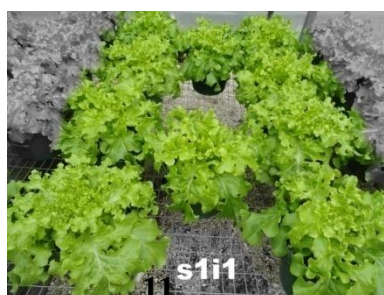


Fotografía 5.- Disposición de los tratamientos en invernadero.

Continuación. Anexo 11.



Fotografías.- 6 testigo absoluto; 7 Agua inoculada con *Azotobacter spp.* ; 8 Cepa de *Azotobacter spp.* Aislada y purificada; 9 Liofilizado de *Azotobacter spp.*



Fotografías 10.- Soporte Jugo de Caña modificado enriquecido inoculado y mantenido por 90 días a 5 °C.



Fotografías 11.- Tierra inoculada y mantenida por 90 días a 5°C

Continuación. Anexo 11.



Fotografías 12.- Turba inoculada y mantenida por 90 días a 20°C



Fotografías 13.- Registro del peso de hojas funcionales.